

**INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE  
MONTERREY**

**CAMPUS MONTERREY  
DIVISIÓN DE BIOTECNOLOGIA Y ALIMENTOS  
PROGRAMA DE GRADUADOS EN BIOTECNOLOGIA**



**TECNOLÓGICO  
DE MONTERREY®**

**“METABOLISMO DE FOLATOS EN FRIJOL NEGRO JAMAPA 81  
(*Phaseolus vulgaris* L.) DURANTE GERMINACIÓN Y DESARROLLO EN  
SIMBIOSIS CON *Rhizobium etli*”**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL  
GRADO ACADÉMICO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA**

**POR:**

**RAFAEL URREA LOPEZ**

MONTERREY, N. L. a

DICIEMBRE DE 2009

**INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE  
MONTERREY**

**CAMPUS MONTERREY  
DIVISIÓN DE BIOTECNOLOGÍA Y ALIMENTOS  
PROGRAMA DE GRADUADOS EN BIOTECNOLOGÍA**

Los miembros del comité de tesis recomendamos que el presente proyecto de tesis presentado por el Ingeniero Rafael Urrea López, sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado académico de:

**Maestro en Ciencias con  
Especialidad en Biotecnología**

Comité de Tesis:

---

Dra. Rocío Isabel Díaz de la Garza  
Asesor

---

Dra. Carmen Hernández Brenes  
Sinodal

---

Dr. Silverio García Lara  
Sinodal

---

Dr. Juan Ignacio Valiente Banuet  
Sinodal

Aprobado:

---

Dr. Mario Moisés Álvarez  
Director de Posgrado de la  
División de Biotecnología y Alimentos  
Diciembre 2009

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi más amplio agradecimiento a la Doctora Rocío Isabel Díaz de la Garza por convertirse en la luz de este camino, su dedicación, lucidez y visión, me alentaron a continuar adelante y son mi ejemplo para encarar los retos del futuro como investigador.

A todos aquellos que estuvieron vinculados de alguna manera a este proyecto e hicieron posible la conclusión del mismo.

También tengo siempre presente a todos mis amigos, quienes siempre me han acompañado, apoyado y enseñado algo. A todos mi mayor reconocimiento y gratitud.

Al Instituto Tecnológico de Monterrey que me abrigó en su programa de formación de Maestría y me otorgó todo su apoyo para concluir satisfactoriamente.

A la Secretaría de Relaciones Exteriores de México por el apoyo económico de manutención durante los dos años de estudios de la Maestría.

Al pueblo Mexicano del cual me declaro gratamente sorprendido y enormemente agradecido.

Al Centro de Biotecnología FEMSA por el invaluable y generoso apoyo que hicieron posible la realización de esta investigación.

## DEDICATORIA

*A mi Madre y a mi Esposa, dos mujeres*

*muy importantes en mi vida.*

## ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	I
DEDICATORIA .....	II
ÍNDICE DE CONTENIDO .....	III
Índice de Figuras .....	VI
Índice de Tablas.....	X
Lista de Abreviaturas.....	XII
Resumen .....	XIV
Capítulo I. INTRODUCCIÓN.....	17
1.1. Contexto de la investigación .....	17
1.2. Justificación e impacto del estudio.....	21
1.3. Objetivo de la investigación.....	25
1.3.1. Objetivo General.....	25
1.3.2. Objetivos Específicos .....	25
2.1. Introducción a la bioquímica de los folatos.....	26
2.1.1. Tipos de folatos .....	26
2.1.2. Síntesis de folatos .....	27
2.1.3. Rol bioquímico de los folatos.....	29
2.1.4. La acumulación de folatos.....	30
2.2. Folatos en los alimentos .....	35
2.3. Enfermedades por deficiencia de folatos.....	37
2.4. Estado Actual de las técnicas analíticas de folatos.....	40
2.4.1. Análisis microbiológico.....	40
2.4.2. Cromatografía líquida de detección electroquímica.....	41
2.4.3. Cromatografía líquida de detección por fluorescencia.....	42
2.4.4. Cromatografía líquida acoplada a masas LC-MS.....	42
2.5. Características del proceso de extracción.....	43
2.5.1. Antioxidantes.....	43

2.5.2.	Extracción de muestras .....	43
2.5.3.	Deconjugación .....	44
2.6.	$\gamma$ -Glutamyl hidrolasa vegetal .....	46
2.7.	Características de la purificación de muestras .....	48
2.7.1.	Columnas ligadoras de folatos .....	48
2.8.	Situación del frijol en México .....	49
2.8.1.	El frijol y la simbiosis con <i>Rhizobium</i> .....	51
2.8.2.	Proceso de infección de <i>Rhizobium</i> .....	54
Capítulo III.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	61
3.1.	Crecimiento de las plantas y tratamientos .....	61
3.2.	Confirmación de infección por <i>Rhizobium</i> .....	64
3.3.	Obtención de proteína ligadora de folatos .....	66
3.4.	Cromatografía de afinidad para folatos .....	67
3.5.	Expresión y purificación de la $\gamma$ -glutamyl hidrolasa .....	68
3.6.	Optimización del proceso de extracción .....	70
3.6.1.	Evaluación de la inactivación enzimática al inicio de la extracción .....	70
3.6.2.	Diseño de programa de HPLC .....	71
3.7.	Extracción de folatos .....	77
3.8.	Análisis por HPLC .....	79
3.9.	Diseño experimental y Análisis Estadístico .....	80
Capítulo IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	82
4.1	Establecimiento de condiciones de extracción de folatos en cotiledón y semilla de frijol. 82	
4.1.1	Evaluación de deconjugación con $\gamma$ -glutamyl hidrolasa .....	83
4.2	Análisis de Folatos de Frijol negro Jamapa 81 .....	85
4.3	Folatos en Cotiledon .....	86
4.4	Folatos en hojas .....	90
4.5	Folatos en raíz .....	96
4.6	Folatos en Hipocótilo .....	101
4.7	Folatos en Embrión .....	104

4.8 Folatos en Epicótulo.....	106
Capítulo V CONCLUSIONES .....	109
Capítulo VI BIBLIOGRAFÍA.....	113

## Índice de Figuras

- Figura 2.1** Estructura química de Tetrahidrofolato ó ácido pteroilglutámico. Tomado de (Varela-Moreiras, Aperte, & Póo Prieto, 2000).
- Figura 2.2** Ruta metabólica de la biosíntesis de folatos. Tomado de (Bekaert et al., 2008).
- Figura 2.3** Metabolismo C<sub>1</sub> mediadas por folatos, en el citoplasma, en la mitocondria y el núcleo. Tomado de (Fox & Stover, 2008).
- Figura 2.4** Tipos de folatos en organelos de hojas de chícharo (*P. sativum*), Tomado de (Orsomando et al., 2005).
- Figura 2.5** Forma de transporte del nitrógeno fijado por los bacteroides al resto de la planta en leguminosas con transporte de tipo ureido. Tomado de (Crawford, Kahn, & Long, 2001).
- Figura 3.1** Estructuras globosas presentes en raíces infectadas por *Rhizobium* (A). Raíces no infectadas (B)
- Figura 3.2** Linealidad de respuesta cromatográfica de diferentes concentraciones en nanogramos de estándares de tetrahidrofolato (THF) y ácido fólico (AF), cuantificados con detector electroquímico, con el programa de gradiente del HPLC desarrollado para folatos monoglutamilados.
- Figura 3.3** Linealidad de respuesta cromatográfica de diferentes concentraciones en nanogramos de estándares de cinco metil tetrahidrofolato (5-CH<sub>3</sub>-THF), cinco, diez tetrahidrofolato (5,10-CH= THF), cinco formil tetrahidrofolato (5-CHO-THF), cuantificados con detector electroquímico, con el programa de gradiente del HPLC desarrollado para folatos monoglutamilados.
- Figura 3.4** Separación de estándares de folatos por HPLC, después de elusión de fase móvil con gradiente, características descritas en Tabla 55, los folatos identificados con detector electroquímico en el cromatograma son: 1.) 5-CH<sub>3</sub>-THF (21.98 min.), 2.) 5,10-CH= THF (24.1 min.), 3.) 5-CHO- THF (25.0 min.), 4.)A.F. (25.8 min.) a diferentes concentraciones.
- Figura 3.5** Cromatograma de muestras de fruto de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill., cv. MicroTom), en la que se observa la respuesta electroquímica de los canales 1, 2, 3 y 4 a 100, 200, 300 y 400 mV, respectivamente. Los folatos observados son: 1.) 5-CH<sub>3</sub>-THF mono.glu (26.7 min.), 2.) 5-CH<sub>3</sub>-THF di-glu



(27.6 min.), 3.) 5-CH<sub>3</sub>- THF tetra-glu (28,5 min.), 4.) 5-CH<sub>3</sub>- THF penta-glu (29.3 min.), 5.) 5-CH<sub>3</sub>- THF hexa-glu (29.7 min.).

**Figura 3.6** Cromatograma de muestras de hoja de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.), los folatos identificados con detector electroquímico en el cromatograma son: 1.) 5-CH<sub>3</sub>-THF mono.glu (26.1 min.), 2.) 5-CH<sub>3</sub>-THF di-glu (27.1 min.), 3.) 5-CH<sub>3</sub>- THF penta-glu (28,5 min.) 4.) 5-CH<sub>3</sub>- THF hexa-glu (29 min.).

**Figura 4.1** Número de veces que se aumenta cada clase de folato cuando la muestra no es hervida antes del tratamiento tri-enzimático. Realizadas por triplicado. Recuperación de AF del 55% (+hervir) y 52% (-hervir). Valores menores a 1 indican disminución.

**Figura 4.2** Efecto del tratamiento de deconjugación desarrollado con  $\gamma$ -glutamyl hidolasa de origen vegetal (GGH) sobre las diferentes formas poliglutamiladas de 5-CH<sub>3</sub>-THF en cotiledón de frijol.

**Figura 4.3** División por tejidos de plántula de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.) a los 10 días de desarrollo para su análisis.

**Figura 4.4** Contenido de las diferentes clases de folatos en Cotiledon de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.). Mediciones realizadas los días 0, 3, 7 y 14 de desarrollo post-germinación, a tratamientos con (+R) y sin (-R) *Rhizobium etli*, así como con (+N<sub>2</sub>) y sin (-N<sub>2</sub>) fuente de nitrógeno. Las barras indican el error estándar calculado para cada clase de folato.

**Figura 4.5** Contenido de folatos totales en cotiledón de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.). Las mediciones fueron realizadas durante los días 0, 3, 7 y 14 de desarrollo post-germinación, en diferentes tratamientos con (+R) y sin (-R) *R. etli*. Las barras indican el error estándar calculado.

**Figura 4.6** Contenido de folatos en raíz, hipocótilo, epicótilo y hoja de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.). Mediciones realizadas durante diferentes días de desarrollo post-germinación, a tratamientos con (+R) y sin (-R) *Rhizobium etli*, así como con (+N<sub>2</sub>) y sin (-N<sub>2</sub>) fuente de nitrógeno. Las barras indican el error estándar calculado para cada clase de folato.

**Figura 4.7** Contenido de folatos totales en hoja de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.). Mediciones realizadas durante los días 10, 18 y 26 de desarrollo post-germinación, a tratamientos con (+R) y sin (-R) *Rhizobium etli*, así como con (+N<sub>2</sub>) y sin (-N<sub>2</sub>) fuente de nitrógeno. Las barras indican el error estándar calculado.

**Figura 4.8** Contenido de las diferentes clases de folatos en hoja de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.). Mediciones realizadas los días 10, 18 y 26 de desarrollo post-germinación, a tratamientos con (+R) y sin (-R) *Rhizobium etli*, así como con (+N<sub>2</sub>) y sin (-N<sub>2</sub>) fuente de nitrógeno. Las barras indican el error estándar calculado para cada clase de folato.

**Figura 4.9** Contenido de folatos poli-glutamilados en hoja de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.). Mediciones realizadas el día 26 de desarrollo post-germinación, a tratamientos con (+R) y sin (-R) *Rhizobium etli*, así como con (+N<sub>2</sub>) y sin (-N<sub>2</sub>) fuente de nitrógeno. Las barras indican el error estándar calculado para cada clase de folato.

**Figura 4.10** Contenido de folatos en raíz de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.). Mediciones realizadas durante los días 7, 18 y 26 de desarrollo post-germinación, a tratamientos con (+R) y sin (-R) *Rhizobium etli*, así como con (+N<sub>2</sub>) y sin (-N<sub>2</sub>) fuente de nitrógeno. Las barras indican el error estándar calculado.

**Figura 4.11** Contenido de las diferentes clases de folatos en raíz de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.). Mediciones realizadas los días 7, 18 y 26 de desarrollo post-germinación, a tratamientos con (+R) y sin (-R) *Rhizobium etli*, así como con (+N<sub>2</sub>) y sin (-N<sub>2</sub>) fuente de nitrógeno. Las barras indican el error estándar calculado para cada clase de folato.

**Figura 4.12** Contenido de folatos poli-glutamilados en raíz de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.). Mediciones realizadas el día 26 de desarrollo post-germinación, a tratamientos con (+R) y sin (-R) *Rhizobium etli*, así como con (+N<sub>2</sub>) y sin (-N<sub>2</sub>) fuente de nitrógeno. Las barras indican el error estándar calculado para cada clase de folato.

**Figura 4.13** Contenido de folatos en hipocótilo de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.). Mediciones realizadas durante diferentes días de desarrollo post-germinación, a tratamientos con (+R) y sin (-R) *Rhizobium etli*, así como con (+N<sub>2</sub>) y sin (-N<sub>2</sub>) fuente de nitrógeno. Las barras indican el error estándar calculado para cada clase de folato.

**Figura 4.14** Contenido de folatos en embrión de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.). Mediciones realizadas durante diferentes días de desarrollo post-germinación, a tratamientos con (+R) y sin (-R) *Rhizobium etli*, así como con (+N<sub>2</sub>) y sin (-N<sub>2</sub>)

fFuente de nitr3geno. Las barras indican el error estandar calculado para cada clase de folato.

**Figura 4.15** Contenido de folatos en epic3tulo de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.). Mediciones realizadas durante diferentes d3as de desarrollo post-germinaci3n, a tratamientos con (+R) y sin (-R) *Rhizobium etli*, as3 como con (+N<sub>2</sub>) y sin (-N<sub>2</sub>) fuente de nitr3geno. Las barras indican el error estandar calculado para cada clase de folato.

## Índice de Tablas

- Tabla 2.1** Diferentes tipos de folatos de acuerdo a con el estado de oxidación ó reducción del anillo de pteridina, adaptado de (Quinlivan, Hanson, & Gregory, 2006)
- Tabla 2.2** Reacciones catalizadas por folatos en el metabolismo C<sub>1</sub>, Tomado de (Fox & Stover, 2008).
- Tabla 2.3** Longitud de las cadenas poliglutamadas en diferentes plantas. Adaptado de (Besson, Rebeille, Neuburger, Douce, & Cossins, 1993; Cossins, 2000)
- Tabla 2.4** Distribución de cadenas de poliglutamados de acuerdo a los tipos de folatos en hojas de brócoli. Adaptado de (Cossins, 2000).
- Tabla 2.5** Contenido de folatos en alimentos, valores en µg de folatos por 100 g de peso verde. Obtenidos por método microbiológico. Adaptado de (Bekaert et al., 2008)
- Tabla 2.6** Número de casos, por 10.000 nacidos vivos, de defectos del tubo neural en México. Adaptado de (Hook, 1992)
- Tabla 2.7** Fijación simbiótica de N<sub>2</sub> por algunos cultivos de leguminosas<sup>1</sup> y especies nativas en sus ambientes naturales en Brazil<sup>2</sup> Adaptado de <sup>1</sup>Gault et al., 1995, <sup>2</sup> Sprent et al., 1996
- Tabla 3.1** Composición de solución nutritiva Hoagland libre de nitrógeno, ajustada a pH 5.8 (Hoagland & Arnon, 1950)
- Tabla 3.2** Composición de solución nutritiva Hoagland, ajustada a pH 5.8 (Hoagland & Arnon, 1950).
- Tabla 3.3** Programa de elución no lineal de las fases móviles en HPLC desarrollado para folatos mono-glutamilados. Fase móvil A contiene (28 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0.59 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 2.5) y la fase móvil B (75% de fase A (vol/vol) y 25% de CH<sub>3</sub>CN).
- Tabla 3.4** Concentraciones en nanogramos de cada especie de folato utilizadas para construir curva de calibración.
- Tabla 3.5** Programa de elución no lineal de las fases móviles en HPLC desarrollado para folatos poli- glutamilados. Fase móvil A contiene (28 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0.59 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 2.5) y la fase móvil B (75% de fase A (vol/vol) y 25% de CH<sub>3</sub>CN).

**Tabla 3.6** Matriz para diseño factorial, de tres factores y dos niveles

**Tabla 4.1** valores *P* obtenidos por prueba T con un nivel de significancia del 5% para contenido de folatos en semilla de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.), en optimización del proceso de extracción, utilizando el programa MINITAB 14

**Tabla 4.2** Valores *P* obtenidos por ANOVA con un nivel de significancia del 5% para contenido de folatos en cotiledón de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.), utilizando el programa MINITAB 14.

**Tabla 4.3** Valores *P* obtenidos por ANOVA con un nivel de significancia del 5% para contenido de folatos en hoja de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.), utilizando el programa MINITAB 14.

**Tabla 4.4** Valores *P* obtenidos por ANOVA con un nivel de significancia del 5% para contenido de folatos en raíz de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.), utilizando el programa MINITAB 14.

**Tabla 4.5** Valores *P* obtenidos por ANOVA con un nivel de significancia del 5% para contenido de folatos en hipocótilo de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.), utilizando el programa MINITAB 14.

**Tabla 4.6** Valores *P* obtenidos por prueba T con un nivel de significancia del 5% para contenido de folatos en Embrión de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.), utilizando el programa MINITAB 14.

**Tabla 4.7** Valores *P* obtenidos por ANOVA con un nivel de significancia del 5% para contenido de folatos en Epicótilo de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.), utilizando el programa MINITAB 14.

## Lista de Abreviaturas

(THF)	Tetrahidrofolato
(PteGlu)	Ácido pteroilglutámico
(5-CHO-THF)	5-formil-tetrahidrofolato
(10-CHO-THF)	10- formil-tetrahidrofolato
(5,10-CH=THF)	5,10-metenil-tetrahidrofolato
(5,10-CH <sub>2</sub> -THF)	5,10-metilen-tetrahidrofolato
(5-NH=CH-THF)	5-formimino-tetrahidrofolato
(5-CH <sub>3</sub> -THF)	5-metil-tetrahidrofolato
(AF)	Ácido fólico
(p-ABA)	p-aminobezoato
(THF-Glu <sub>n</sub> )	Tetrahidrofolato poliglutamilado
(HPLC)	Cromatografía líquida de alta resolución
(LC-FD)	Cromatografía líquida con detector de fluorescencia
(LC-MS)	Cromatografía líquida acoplada a masas
(SIDA)	Análisis de dilución de isótopos estables
(GGH)	γ-glutamyl-hidrolasa
(AtGGH)	γ-glutamyl-hidrolasa de <i>Arabidopsis thaliana</i>
(Ado-Met)	S-adenosilmetionina
(C <sub>1</sub> )	Metabolismo de unidades de un carbono
(FPGS )	Folilpoliglutamyl sintetasa, (EC 6.3.2.17)
(MTHFR)	5,10 Meteniltetrahidrofolato reductasa (EC 3.5.4.9)
(HPPK-DHPS)	dihidropterina pirofosforoquinasa-dihidropteroato sintetasa
(RT-PCR)	análisis de transcripción reversa de la polimerasa
(FBP)	Proteína ligadora de folatos

(YMA)	Agar Manitol-extracto de levadura
(PYA)	Agar Peptona-extracto de levadura
(PGA)	Agar Peptona-glucosa
(ANOVA)	Análisis de varianza
(ADN)	Ácido desoxirribonucleico
(INEGI)	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática.

## Resumen

El tetrahidrofolato (THF) y sus derivados (folatos) participan en la transferencia de moléculas de un carbono en los organismos, y al no ser producidos por el hombre, es indispensable consumirlos de la dieta. En este estudio, se analizaron los niveles de folatos en semillas y diferentes tejidos de frijol negro durante germinación y desarrollo, inoculado con (+*R*) y sin (-*R*) *R. etli*, una bacteria nitrificante, así como con (+N<sub>2</sub>) y sin (-N<sub>2</sub>) fuente de nitrógeno. Para el análisis de folatos en frijol, se adaptaron e innovaron técnicas analíticas. Todos los tejidos presentaron THF, 5-metil-THF 5-formil-THF y 5,10-metenil-THF, este último excepto el embrión, siendo THF el más abundante. Los contenidos de folatos en semilla seca fueron en promedio 2.32 nmol/g. En germinación, los embriones +*R* presentaron 2.12 veces más folatos que los -*R*, y en los cotiledones el comportamiento fue inverso. Las plantas +*R*,-N<sub>2</sub> presentaron mayores contenidos de folatos totales en casi todos los tejidos, siendo los jóvenes los que acumulan mayor cantidad. El 5-metil-THF monoglutamilado, clase con la menor afinidad a la retención celular, fue encontrado únicamente en raíz +*R*,-N<sub>2</sub>. Los resultados de esta investigación establecen los contenidos de folatos de una fuente importante en la dieta latinoamericana, demuestran que la deficiencia en nitrógeno ocasiona disminución en el *pool* de folatos en todos los tejidos, indican el efecto positivo de la simbiosis en todos los tejidos, y sugieren que al ser THF el principal folato presente en frijol, los contenidos de la vitamina pueden tener pérdidas importantes durante el procesado.



## **Capítulo I. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Contexto de la investigación**

En Septiembre del 2000 se aprobó por parte de las Naciones Unidas la “Declaración del Milenio” la cual estableció los Objetivos de Desarrollo del Milenio, entre los cuales está erradicar la pobreza extrema y el hambre y reducir la mortalidad infantil. Los estados y los sistemas económicos tienen un papel determinante en el cumplimiento de estos retos, sin embargo, desde el ámbito científico también se puede contribuir al logro de estos objetivos que mejorarían la calidad de vida de millones de personas.

Una forma de contribuir al cumplimiento, en especial, de estos dos objetivos es encontrar alternativas para disminuir la desnutrición por micronutrientes de las personas en mayor riesgo, la cual está relacionada con la pobreza y la mortalidad infantil.

En la actualidad los problemas en seguridad alimentaria afectan amplios sectores de la población mundial; las comunidades pobres y rurales de los países en desarrollo son las más vulnerables. En los países en vía de desarrollo la desnutrición por el consumo insuficiente de nutrientes, tales como vitamina A, B<sub>6</sub>, B<sub>9</sub>, B<sub>12</sub>, C, D, E, K, calcio, tiamina, riboflavina, niacina, biotina, ácido pantoténico, selenio, magnesio, zinc, hierro y, yodo, llamados comúnmente micronutrientes, los cuales en cantidades minúsculas permiten al organismo producir enzimas, hormonas y otras sustancias esenciales para su desarrollo. Deficiencias en su consumo constituyen un problema de salud general, persistente y prevenible (Darnton-Hill et al., 2005). Está demostrado que el

consumo inadecuado de micronutrientes contribuye al incremento en las tasas de morbilidad y mortalidad, a la disminución de los medios de subsistencia, y tiene efectos negativos en la habilidad de aprendizaje, desarrollo y crecimiento de jóvenes y niños (Caballero, 2002; WHO, 1999). La desnutrición por micronutrientes afecta a más de la mitad de la población mundial (Mayer, Pfeiffer, Beyer, 2008), y es de proporciones alarmantes en muchos países en desarrollo (Mason & Garcia, 1993; WHO, 2002). La UNICEF estima que 209 millones de personas no consumen la suficiente vitamina A, la deficiencia de Yodo afecta a 52% de la población europea y al 42% de la población africana, la deficiencia en hierro afecta al 25% de la población mundial. En México para el 2006 el 38% de los niños menores de 2 años sufrían de anemia (UNICEF, 2009).

La desnutrición por micronutrientes es uno de los mayores impedimentos para el desarrollo socio-económico y contribuye al círculo vicioso del subdesarrollo y al detrimento de los grupos menos privilegiados. También tiene efectos a largo plazo sobre la salud, la capacidad de aprendizaje y la productividad, esto conlleva altísimos costos sociales y públicos al reducir la capacidad laboral de la población debido a las altas tasas de discapacidad y enfermedad, y a una trágica pérdida del potencial humano. Revertir la desnutrición por micronutrientes es un requisito para garantizar un apropiado y rápido desarrollo (FAO, 1997).

Dentro de las deficiencias por micronutrientes, la específica de folatos constituye un problema de salud pública mundial (Bekaert et al., 2008), cuya magnitud es desconocida para muchos países por la falta de mayor información epidemiológica (McLean, de Benoist, & Allen, 2008). El consumo inadecuado de folatos puede causar anemia megaloblástica, defectos del tubo neural en

recién nacidos, así como el incremento de enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer (Bailey, 1995; Baily, 1995; Choi & Mason, 2000; Czeizel & Dudas, 1992; Herbert, 1967; Hines, Halsted, Griggs, & Harris, 1968; Kim, 1999; Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group," 1991; Rimm, 2001). Se estima que la deficiencia de folatos causa alrededor de 210,000 defectos severos de nacimiento cada año (Adamson, P., 2004).

El consumo adecuado de folatos es importante por cuanto estos contribuyen a la síntesis de numerosos compuestos y a la regulación de muchos procesos metabólicos, eliminar la desnutrición por micronutrientes es importante porque este es uno de los mayores impedimentos para el desarrollo socio-económico de los grupos menos privilegiados (FAO, 1997).

La biofortificación es una opción complementaria a la fortificación de alimentos procesados, ya que a diferencia de la primera, ésta busca el incremento de los niveles de micronutrientes producidos de forma endógena en las plantas. Esto se puede lograr por medio de la mejoramiento tradicional de cultivos sobreproductores de micronutrientes específicos o mediante técnicas del ADN recombinante. La ventaja de la biofortificación, es que puede ser implementada en cultivos producidos y consumidos por comunidades pobres y rurales. Estas intervenciones tienen el potencial de ser sostenibles, a diferencia de la suplementación y fortificación, cuyos programas no han demostrado sustentabilidad en muchos países en desarrollo (Subbulakshmi & Naik, 1999; Yip, 1997). En la actualidad se han logrado avances significativos en biofortificación en plantas con vitamina E y pro-vitamina A (DellaPenna & Pogson, 2006; Shintani & DellaPenna, 1998;

Ye, et al., 2000); con folatos en tomate (Diaz de la Garza, Gregory, & Hanson, 2007) y en arroz (Storozhenko, et al., 2007) y biofortificación de Fe en Frijol (Tako, et al., 2009).

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es una leguminosa de grano, que proporciona cantidades significativas de energía y es fuente de vitaminas y minerales (Geil & Anderson, 1994), es uno de los cultivos con más proteínas de origen vegetal (Sathe, Deshpande, & Salunkhe, 1984) y ocupa un lugar importante dentro de la dieta de la población latinoamericana siendo la principal fuente de proteínas de las poblaciones marginadas (Gentry, 1969; SEGEPLAN, 1991; Velazquez et al., 2003), su consumo junto con el maíz aportan del 20 al 25% de proteínas y entre el 50 y el 60% de carbohidratos de la dieta de la población rural mexicana (Broughton, et al., 2003). Se estima que el consumo per cápita para 2008 fue de 12 kilos, superior al 9.4 kilos de 2007 (SAGARPA, 2009).

Por lo anterior el frijol aparece como candidato para contribuir en la lucha contra la desnutrición de micronutrientes debido a su amplio consumo en México y en toda América Latina. Entre las diversas variedades de frijol sembrado en México el negro tiene el 39% de la producción (Bank, 2007), y es preferido en la región del trópico húmedo (Acosta G. J. A., 2003). El frijol negro además, ha sido objeto de trabajos de biofortificación en hierro, los cuales han demostrado ser un vehículo promisorio para el incremento en el consumo de hierro (Tako et al., 2009). El frijol negro, en particular el genotipo Mesoamericano, negro Jamapa 81 (*Phaseolus vulgaris* L.), ha sido ampliamente estudiado y en la actualidad se dispone de información que proporciona herramientas de genética y genómica para su mejora a través de ingeniería metabólica (Ramirez et al., 2005).

## 1.2. Justificación e impacto del estudio

Para el desarrollo de un programa de biofortificación de folatos en frijol se requiere de información básica sobre los contenidos naturales de folatos en la planta. Sin embargo, la información actual de contenidos de folatos disponible en tablas de composición de alimentos es escasa y poco confiable (Konings et al., 2001). Por lo que se requiere de una técnica analítica que permita la identificación y cuantificación de las diversas clases de folatos en frijol antes, durante y después del proceso de ingeniería metabólica.

La información actual sobre contenidos de folatos en frijol ha sido obtenida mediante análisis microbiológico (Augustin, Klein, Becker, & Venugopal, 1985; Hoppner & Lampi, 1992; Hyun & Tamura, 2005; Melse-Boonstra et al., 2002; USDA, 2005), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a detector de fluorescencia (LC-FD) (Muller, 1993), y espectrometría de masas (LC-MS) en especial análisis de dilución de isótopos estables (Rychlik, Englert, Kapfer, & Kirchoff, 2007).

Aunque el método oficial de análisis de contenidos totales de folatos es mediante análisis microbiológico y el micro-organismo más utilizado es el *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 (Kariluoto, 2008), los errores debidos a las diferentes respuestas de los microorganismos a los folatos pueden invalidar los resultados (Rychlik, et al., 2007), además el microorganismo puede responder a folatos mono-, di- y triglutamato (Konings, et al., 2001), por lo que, la presencia de folatos poli-glutamatos ( $\geq$  tetraglutamato) puede resultar en una baja estimación de la concentración total de folatos y en una sobre estimación de los folatos libres ( $\leq$  triglutamatos).

Por esta razón, el uso del análisis microbiológico para la medición de folatos libres debe ser remplazado (Quinlivan, Basset, Gregory, & Hanson, 2005).

Los folatos son componentes ideales para la detección electroquímica debido a que los grupos constituyentes de la molécula de pteridina son fácilmente oxidados (Quinlivan, Hanson, & Gregory, 2006). Además, las clases de folatos tienen distintos potenciales de oxidación (Kohashi, Inoue, Sotobayashi, & Iwai, 1986), debido a las diferencias en el estado oxidativo y a la sustitución de 1-carbono en la molécula de pterina y, por tanto son fácilmente distinguibles (Quinlivan, et al., 2006). Las diferentes clases de folatos tienen distintas propiedades electroquímicas (Bagley & Selhub, 2000), que son independientes de la longitud de la cadena de glutamatos, en consecuencia es posible cuantificar los folatos de acuerdo a sus diferentes clases y a su grado de glutamilación.

La presente investigación tiene como fin la generación de información de los contenidos de las diferentes clases de folatos en frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.), mediante identificación y cuantificación por medio de HPLC acoplado a detector electroquímico.

El proceso permitirá desarrollar la técnica analítica de extracción, purificación y cuantificación de folatos para frijol, mediante tratamiento trienzimático y detección electroquímica dadas sus ventajas sobre el análisis microbiológico, la detección por fluorescencia y por espectrometría de masas, en cuanto a especificidad y sensibilidad.

La maquinaria fotosintética demanda más de la mitad del nitrógeno presente en las hojas (Evans & Seeman, 1989), por lo que la fotosíntesis es fuertemente afectada por la disponibilidad de nitrógeno. El costo de fijación de nitrógeno para plantas simbióticas es de 25% de todo el carbono fijado por la fotosíntesis durante un día, en comparación con un 13% en plantas con disponibilidad óptima de nutrientes (Crawford, Kahn, & Long, 2001). Por lo que una planta dependiente de *Rhizobium* como fuente de nitrógeno tendrá un mayor gasto energético para garantizar su fuente de nitrógeno, en este sentido presumimos que un mayor metabolismo requerirá de mayores contenidos de folatos para garantizar un adecuado funcionamiento del metabolismo C-1.

En este sentido la información resultante de la presente investigación permitirá: Conocer los niveles normales de folatos en frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.), inoculado y sin inocular con *R. etli*, bacteria nitrificante con la cual habitualmente hace endosimbiosis, así como las diferentes clases de folatos presentes y sus concentraciones; también proveerá información acerca de las diferentes clases de folatos requeridos durante el proceso de germinación permitiendo relacionarlo con los requerimientos específicos de los procesos fisiológicos de la planta.

De igual manera se busca obtener información de la proporción de los folatos almacenados, los disponibles para las reacciones enzimáticas y los libres para su transporte, a partir del grado de glutamilación de las moléculas de folatos.

La información generada contribuirá al conocimiento de la fisiología celular vegetal de esta especie y podría ser útil para proyectos de biofortificación de folatos a través de ingeniería metabólica de la planta, contribuyendo a situar una especie fundamental para la dieta alimenticia latinoamericana entre las de potencial desarrollo de biofortificación de folatos.



### 1.3. Objetivo de la investigación

#### 1.3.1. Objetivo General

Caracterizar y cuantificar los contenidos de diferentes clases de folatos presentes en frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.), durante el desarrollo post-germinación en simbiosis con *R. etli*.

#### 1.3.2. Objetivos Específicos

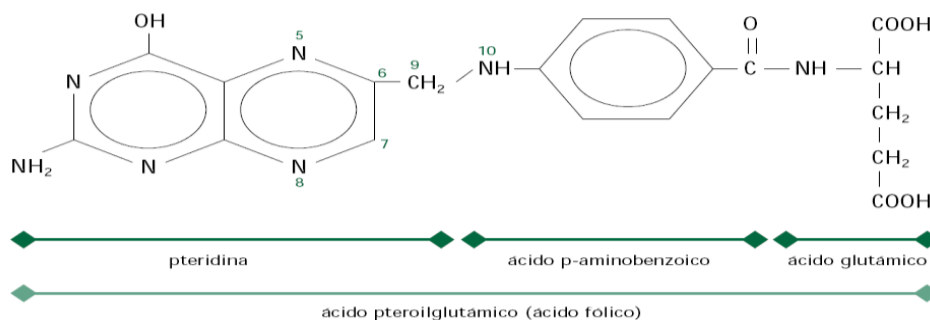
1. Optimizar y validar un método de HPLC para obtener información más detallada y válida de las diferentes clases de folatos y su grado de glutamilación en Frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.).
2. Implementar en la técnica analítica la deglutamilación de folatos utilizando la enzima vegetal  $\gamma$ -glutamyl-hidrolasa (GGH).
3. Cuantificar los niveles de las diferentes clases de folatos y su grado de glutamilación, en Frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.) en diferentes estadios de desarrollo fisiológico post-germinación.
4. Conocer el efecto de *R. etli* sobre el contenido de folatos en Frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.)

## Capítulo II. ANTECEDENTES

### 2.1. Introducción a la bioquímica de los folatos

#### 2.1.1. Tipos de folatos

Las células contienen diferentes derivados de tetrahidrofolato (THF) que participan en el metabolismo de un carbono. Todos los folatos tienen en común la estructura del ácido pteroilglutámico (PteGlu), molécula constituida por un anillo de pteridina unido por un puente metileno a un residuo de ácido p-aminobenzoico, que a su vez se une por un enlace amida a un residuo de ácido glutámico (E. A. Cossins, 1980). Los diferentes folatos se diferencian en el anillo de pteridina, que puede presentar varias formas reducidas y varios tipos de sustituciones, y en el residuo de p-aminobenzoglutamato, que puede presentar unidos en enlace peptídico un número variable de residuos glutámicos unidos a su estructura (Figura 2.1, Tabla 2.1) (Varela-Moreiras, Aperte, & Póo Prieto, 2000).



**Figura 2.1** Estructura química de Tetrahidrofolato ó ácido pteroilglutámico. Tomado de (Varela-Moreiras, et al., 2000).

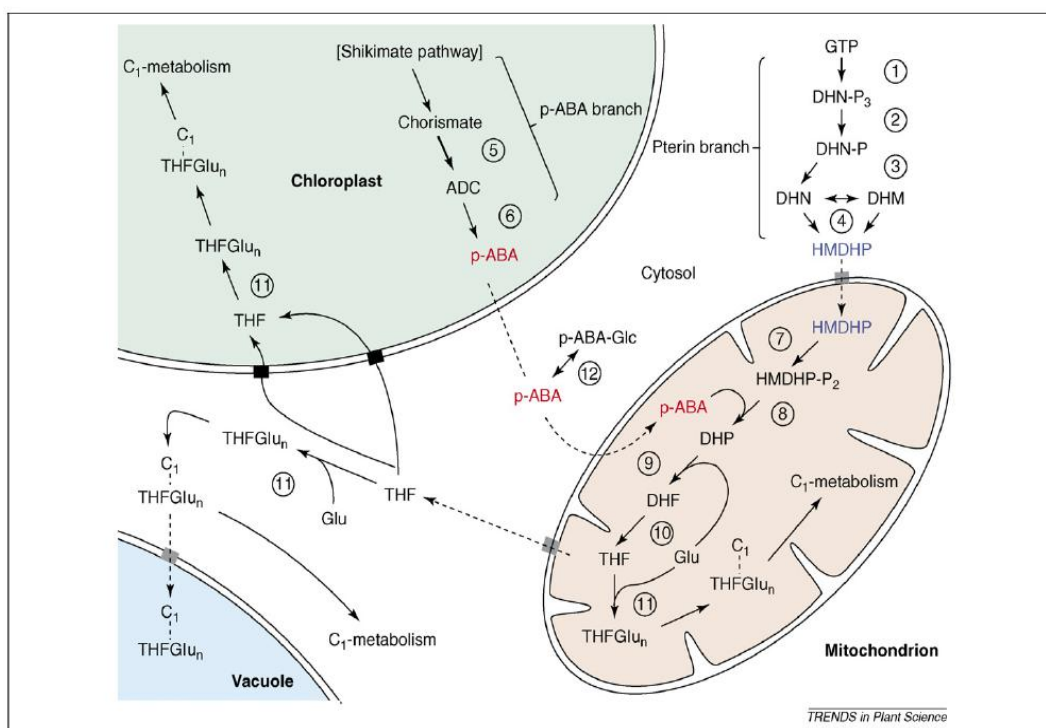
**Tabla 2.1** Diferentes tipos de folatos de acuerdo a con el estado de oxidación ó reducción del anillo de pteridina, adaptado de (Quinlivan, Hanson, & Gregory, 2006)

Estados de Oxidación	Unidad de 1-Carbono	Nombre común	Abreviatura
más oxidadas	$N^5 - CHO$	5-formil-tetrahidrofolato	5-CHO-THF
	$OHC - N^{10}$	10- formil-tetrahidrofolato	10-CHO-THF
	$N^5 - CH - N^{10}$	5,10-metenil-tetrahidrofolato	5,10-CH=THF
intermedias	$N^5 - CH_2 - N^{10}$	5,10-metilen-tetrahidrofolato	5,10- $CH_2$ -THF
	$N^5 - CH=NH$	5-formimino-tetrahidrofolato	5-NH=CH-THF
más reducidas	$N^5 - CH_3$	5-metil-tetrahidrofolato	5- $CH_3$ -THF

### 2.1.2. Síntesis de folatos

Las tres partes de la molécula de THF – la pteridina, p-aminobezoato (p-ABA) y las moléculas de glutamato (Figura 2.1) son producidas por separado en plástidos mitocondria y citosol para luego ser unidas en la matriz mitocondrial. (Figura 2.2). La molécula de pteridina es formada a partir de trifosfato de guanósina en el citosol y la molécula de p-ABA producida a partir de corismato (Sahr, Ravanel, & Rebeille, 2005), es producida en los plástidos. Pteridina y p-ABA luego son transportadas a la mitocondria, donde son unidas y reducidas para formar THF. En la mitocondria, en los plástidos o en el citosol, se añaden glutamatos, a través de la folilpoliglutamato sinteasa, produciendo folatos poliglutamilados (THF-Glu<sub>n</sub>).

Los folatos en las plantas se encuentran tanto en las vacuolas como en el citosol, mitocondria y plástidos (Jabrin, Ravel, Gambonnet, Douce, & Rebeille, 2003; Orsomando et al., 2005). Por tanto, la distribución intracelular y localización de los folatos requiere varios pasos de transporte (Figura 2.2) Sin embargo los únicos dos transportadores identificados hasta el momento son de plástidos (Bedhomme et al., 2005; Klaus et al., 2005), por lo que se requiere mayor investigación en este campo.



**Figura 2.2** Ruta metabólica de la biosíntesis de folatos. En las células vegetales la biosíntesis de folatos se presenta en diferentes organelos y los pasos están mediados por transportadores. Los dos transportadores conocidos (ambos en plástidos) son mostrados en negro. Abreviaciones de los compuestos: ADC, aminodeoxicorismato; DHF, dihidrofolato; DHM, dihidromonapterin; DHN, dihidroneopterin; DHP, dihidropteroato; -Glc, glucosa ester; -Glu<sub>n</sub>, poliglutamato; HMDHP, hidroximetildihidropterin; -P, fosfato; -P<sub>2</sub>, difosfato; -P<sub>3</sub>, trifosfato; THF, tetrahidrofolato. Enzimas: 1, GTP ciclohrolasa I; 2, DHN-P<sub>3</sub> pirofosfatasa; 3, fosfatasa no-especifica; 4, dihidroneopterin aldolasa; 5, aminodeoxicorismato sintasa; 6,

aminodeoxicorismato liasa; 7, hidroximetildihidropterin pirofosfoquinasa; 8, dihidropteroato sintasa; 9, dihidrofolato sintasa; 10, dihidrofolato reductasa; 11, folilpoliglutamato sintasa; 12, p-ABA glucosiltransferasa. Tomado de (Bekaert et al., 2008).

### 2.1.3. Rol bioquímico de los folatos

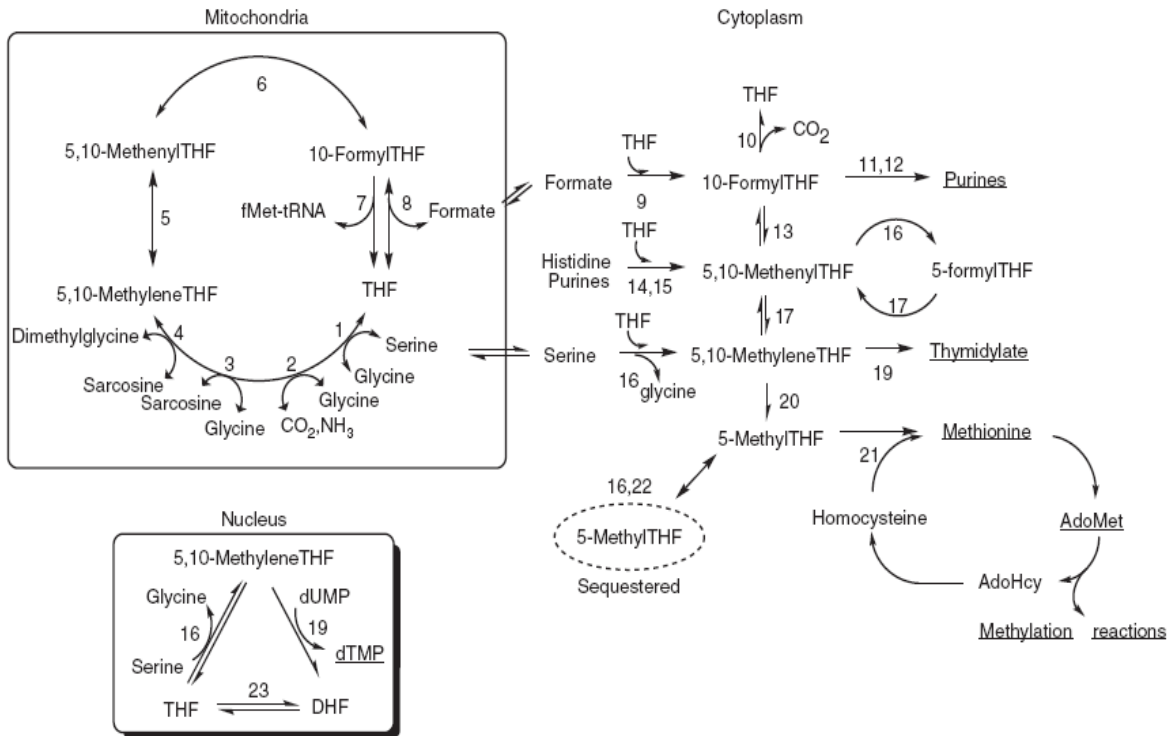
La función metabólica de los folatos en plantas, microbios y animales es muy similar (E. A. Cossins & Chen, 1997; M. Lucock, 2000; Matthews, 1996; J. Scott, Rebeille, & Fletcher, 2000).

La adición o remoción de unidades de un carbono (metabolismo  $C_1$ ) es de vital importancia en la regulación de muchos procesos metabólicos, tales como la síntesis de serina y formilmetionil-*t*RNA (E. A. Cossins, 1980, 1987), la interconversión de glicina y serina (Ravel et al., 2001), la síntesis de ácidos nucleicos, metionina y pantotenato y la biogénesis de algunos fitoquímicos metilados tales como colina, lignina, pectina, clorofila, antocianinas, alcaloides y flavonoides (Hanson & Roje, 2001; Ravel, Gakiere, Job, & Douce, 1998), requieren de. La S-adenosilmetionina (Ado-Met) y los derivados del THF, conocidos colectivamente como folatos (Hanson & Gregory, 2002), median la mayoría de esas transferencias de unidades de un carbono. Por lo tanto la mayoría de las reacciones del metabolismo  $C_1$  dependen de la disponibilidad de folatos como cofactor (Sahr, et al., 2005).

Las formas de un carbono de THF pueden ser interconvertidas enzimáticamente, sin embargo cada forma de cofactor es específica a una ruta (Porter, Cook, & Wagner, 1985; Shane, 1989; Woeller, Anderson, Szebenyi, & Stover, 2007). El grupo formil del 10-CHO-THF es utilizado en la síntesis de formilmetionil-*t*RNA en mitocondria (E. A. Cossins, 1987; Staben & Rabinowitz, 1983). La molécula 5,10- $CH_2$ -THF es requerida en la conversión de uridilato a timidilato y el carbono acarreado por 5- $CH_3$ -THF es requerido en remetilación de la

homocisteína a metionina (Figura 2.3) (Clandinin & Cossins, 1972; Coffin & Cossins, 1986).

Las reacciones en las que intervienen los folatos pueden verse en la Tabla 2.2.



**Figura 2.3** Metabolismo C<sub>1</sub> mediadas por folatos, en el citoplasma, en la mitocondria y el núcleo. Tomado de (Fox & Stover, 2008).

#### 2.1.4. La acumulación de folatos

El alargamiento de la cadena de glutamato es el principal medio por el cual se produce la acumulación de folato celular en los diferentes compartimentos como vacuolas y mitocondrias. La poliglutamilación previene la salida de folato a través de las membranas celulares (Shane, 1989). El alargamiento de la cadena afecta las propiedades de transporte de la coenzima al

disminuir la afinidad por el transportador de membrana, también altera las propiedades cinéticas de muchas enzimas del metabolismo  $C_1$ , por lo que cumple una función importante como regulador de este metabolismo, esto debido a que un gran número de enzimas dependientes de folatos presentan alta afinidad por las formas poliglutamiladas de sus substratos que de las correspondientes monoglutamiladas (McGuire & Coward, 1984; Schirch & Strong, 1989), mientras que la mayoría de las que los transportan prefieren los monoglutamatos (Brzezinska, Winska, & Balinska, 2000; Matherly & Goldman, 2003; Shane, 1989). La cola de glutamatos aumenta la estabilidad de los folatos debido a que cuando los folatos se unen a las proteínas son menos propensos a la degradación oxidativa (J. Scott, et al., 2000). La aparente longitud mínima necesaria para la retención celular de folato es triglutamato (Lowe et al., 1993; Osborne, Lowe, & Shane, 1993).

Los folatos sufren espontánea escisión oxidativa o foto-oxidativa del enlace  $C_9-N_{10}$  a pH fisiológico, produciendo pteridina y p-aminobenzoglutamato ó sus formas poliglutamadas (Gregory, 1989). Dicha división no-enzimática se cree que es la principal manera en que los folatos se destruyen en todos los organismos (J. M. Scott, 1984; Suh, Herbig, & Stover, 2001), por lo que los folatos pueden ser degradados rápidamente en tejidos iluminados (Hanson & Gregory, 2002).

Los folatos poliglutamatos en plantas, como en otros organismos (E. A. Cossins, 1984), presentan una diversidad de cadena de glutamatos que varía entre las especies (C. Chan, Shin, & Stokstad, 1973; H., L., & E.A., 1990; Li-Li, Ying, Song, & Cossins, 1992). La enzima encargada de añadir las cadenas de ácidos glutámicos es la folilpoliglutamil sintetasa, FPGS (EC

6.3.2.17) responsable de la conversión intracelular de formas naturales de monoglutamatos a sus formas poliglutamadas (E. A. Cossins, 1987; McGuire & Coward, 1984). En plantas presenta isoformas en mitocondria, plástidos y citosol (E. Cossins, 2000; Ravanel, et al., 2001).

**Tabla 2.2** Reacciones catalizadas por folatos en el metabolismo C<sub>1</sub>, Tomado de (Fox, 2008)

Folate-dependent enzymes	EC No.	Localization	Reaction catalyzed
<b>One-carbon activating</b>			
10-Formyltetrahydrofolate synthetase	6.3.4.3	Cytoplasm	ATP + formate + tetrahydrofolate = ADP + phosphate + 10-formyltetrahydrofolate
10-Formyltetrahydrofolate dehydrogenase	1.5.1.6	Cytoplasm	10-Formyltetrahydrofolate + NADP <sup>+</sup> + H <sub>2</sub> O = tetrahydrofolate + CO <sub>2</sub> + NADPH + H <sup>+</sup>
Cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase	2.1.2.1	Cytoplasm and nucleus	5,10-Methylenetetrahydrofolate + glycine + H <sub>2</sub> O = tetrahydrofolate + L-serine
Glycine formiminotransferase	2.1.2.4	Cytoplasm	N-formiminoglycine + tetrahydrofolate ⇒ glycine + 5-formiminotetrahydrofolate
Glutamate formiminotransferase	2.1.2.5	Cytoplasm	N-formiminoglutamate + tetrahydrofolate ⇒ glutamate + 5-formiminotetrahydrofolate
Mitochondrial serine hydroxymethyltransferase	2.1.2.1	Mitochondrion	5,10-Methylenetetrahydrofolate + glycine + H <sub>2</sub> O = tetrahydrofolate + L-serine
Sarcosine dehydrogenase	1.5.99.1	Mitochondrion	Sarcosine + acceptor + H <sub>2</sub> O = glycine + formaldehyde + reduced acceptor
Dimethylglycine dehydrogenase	1.5.99.2	Mitochondrion	N,N-dimethylglycine + acceptor + H <sub>2</sub> O = sarcosine + formaldehyde + reduced acceptor
Aminomethyltransferase	2.1.2.10	Mitochondrion	[Protein]-S8-aminomethyl-dihydrolipoylysine + tetrahydrofolate = [protein]-dihydrolipoylysine + 5,10-methylenetetrahydrofolate + NH <sub>3</sub>
<b>One-carbon interconverting enzymes</b>			
5,10-Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP-dependent)	1.5.1.5	Cytoplasm	5,10-Methylenetetrahydrofolate + NADP <sup>+</sup> = 5,10-methenyltetrahydrofolate + NADPH + H <sup>+</sup>
5,10-Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NAD-dependent)	1.5.1.15	Mitochondrion	5,10-Methylenetetrahydrofolate + NAD <sup>+</sup> = 5,10-methenyltetrahydrofolate + NADH + H <sup>+</sup>
5,10-Methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	3.5.4.9	Cytoplasm	5,10-Methenyltetrahydrofolate + H <sub>2</sub> O = 10-formyltetrahydrofolate
Methenyltetrahydrofolate synthetase	6.3.3.2	Cytoplasm	ATP + 5-formyltetrahydrofolate = ADP + phosphate + 5,10-methenyltetrahydrofolate
Methylenetetrahydrofolate reductase	1.5.1.20	Cytoplasm	5-Methyltetrahydrofolate + NAD(P) <sup>+</sup> = 5,10-methylenetetrahydrofolate + NAD(P)H + H <sup>+</sup>
Dihydrofolate reductase	1.5.1.3	Cytoplasm and nucleus	5,6,7,8-Tetrahydrofolate + NADP <sup>+</sup> = 7,8-dihydrofolate + NADPH + H <sup>+</sup>
Formimidoyltetrahydrofolate cyclodeaminase	4.3.1.4	Cytoplasm	5-Formimidoyltetrahydrofolate = 5,10-methenyltetrahydrofolate + NH <sub>3</sub>
<b>Biosynthetic enzymes</b>			
Phosphoribosylglycinamide formyltransferase	2.1.2.2	Cytoplasm	10-Formyltetrahydrofolate + N1-(5-phospho-D-ribosyl) glycinamide = tetrahydrofolate + N2-formyl-N1-(5-phospho-D-ribosyl)glycinamide
Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase	2.1.2.3	Cytoplasm	10-Formyltetrahydrofolate + 5-amino-1-(5-phospho-D-ribosyl)imidazole-4-carboxamide = tetrahydrofolate + 5-formamido-1-(5-phospho-D-ribosyl)imidazole-4-carboxamide
Methionine synthase	2.1.1.13	Cytoplasm	5-Methyltetrahydrofolate + L-homocysteine = tetrahydrofolate + L-methionine
Thymidylate synthase	2.1.1.45	Cytoplasm and nucleus	5,10-Methylenetetrahydrofolate + dUMP = dihydrofolate + dTMP
Methionyl-tRNA formyltransferase	2.1.2.9	Mitochondrion	10-Formyltetrahydrofolate + L-methionyl-tRNA <sup>Met</sup> + H <sub>2</sub> O = tetrahydrofolate + N-formylmethionyl-tRNA <sup>Met</sup>
<b>Other folate-binding proteins</b>			
Glycine N-methyltransferase	2.1.1.20	Cytoplasm	S-adenosyl-L-methionine + glycine = S-adenosyl-L-homocysteine + sarcosine



La enzima que remueve las colas de glutamatos es la  $\gamma$ -glutamyl hidrolasa, GGH (EC 3.4.22.12) y se presenta en muchos organismos incluyendo las plantas superiores (McGuire & Coward, 1984). Los folatos poliglutamados existen en un estado dinámico dentro de las células, siendo hidrolizados por la GGH y luego re sintetizados por la FPGS (Kalman, 1990). En las plantas la ubicación subcelular de la GGH, ha sido propuesta en el citosol (Lin, Rogiers, & Cossins, 1993) o extracelular (Huangpu, Pak, Graham, Rickle, & Graham, 1996), recientemente se demostró en hoja de chícharo (*Pisum sativum*) que la actividad de la GGH es vacuolar (Orsomando, et al., 2005).

La longitud de las cadenas de glutamatos en los folatos en plantas puede ser variable (Li-Li, et al., 1992). Extractos de coliflor y brócoli contienen niveles de folatos que van desde Glu<sub>4</sub> hasta Glu<sub>8</sub> (Tabla 2.3), pero en zanahorias cerca del 70% de los folatos recuperados son Glu<sub>2</sub> (E. Cossins, 2000). La distribución de las diferentes clases de folatos en una planta también es variable. (Tabla 2.4)

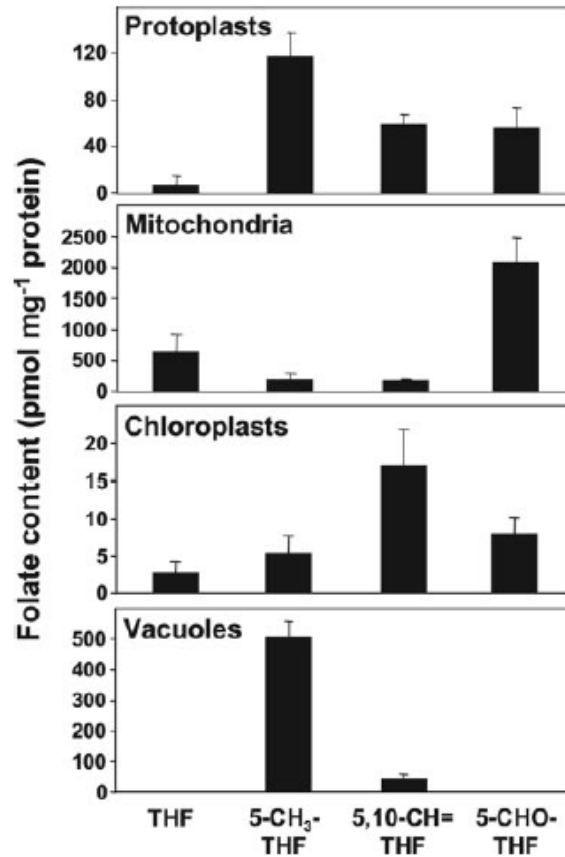
Los folatos se encuentran en los diferentes compartimentos de las células vegetales (Figura 2.4) (Besson, et al., 1993), sin embargo, es poco lo que se conoce acerca de la distribución en plantas de los folatos poliglutamados en los diferentes organelos (Orsomando, et al., 2005). Solamente hay información para hojas de chícharos (*P. sativum*), en donde los penta y tetraglutamatos de 5-CHO-THF y THF predominan en mitocondria y 5CH<sub>3</sub>-THF (de longitud de poliglutamatos desconocida) en el resto (Besson, et al., 1993; S. Y. Chan & Cossins, 2003; Chen, Chan, & Cossins, 1997).

**Tabla 2.3** Longitud de las cadenas poliglutamadas en diferentes plantas. Los datos de folatos totales están expresados en nanomoles por gramo de peso fresco. Los datos de longitud de glutamatos esta expresada en porcentaje del total de poliglutamados recuperados después de escisión con Zn-HCL y medición por HPLC. Adaptado de (Besson, Rebeille, Neuburger, Douce, & Cossins, 1993; E. Cossins, 2000)

Especie	Folatos totales nmol /g	Distribución de los poliglutamatos (%)					
		Glu <sub>2</sub>	Glu <sub>3</sub>	Glu <sub>4</sub>	Glu <sub>5</sub>	Glu <sub>6</sub>	Glu <sub>7</sub>
Coliflor, cabezas florales	0.81	22.7	7.8	-	4.5	22.2	36.0
Brócoli, cabezas florales	1.37	47.9	19.5	-	4.4	7.2	13.2
Lechuga, hojas	1.87	19.4	26.9	16.5	37.1	-	-
Col, hojas	0.26	49.6	-	23.4	27.3	-	-
Zanahoria, raíz	0.22	69.3	18.6	-	12.1	-	-
Chícharo, hojas	4.65	46		15	38	-	-

**Tabla 2.4** Distribución de cadenas de poliglutamados de acuerdo a los tipos de folatos en hojas de brócoli. Adaptado de (E. Cossins, 2000). nd= No detectable

Tipos de Folatos en hojas de brócoli	% de Folatos Totales	Contenido de poliglutamados (nmol/g peso fresco)				
		Glu <sub>2</sub>	Glu <sub>4</sub>	Glu <sub>5</sub>	Glu <sub>6</sub>	Glu <sub>7</sub>
CH <sub>2</sub> -THF, THF, DHF	19.6	Traza	nd	0.23	0.83	nd
CH <sub>3</sub> -THF	74.0	3.23	0.19	nd	nd	0.59
CHO-THF, CH=THF	6.5	0.28	0.02	nd	nd	0.05



**Figura 2.4** Tipos de folatos en organelos de hojas de chícharo (*P. sativum*), Tomado de (Orsomando, et al., 2005).

## 2.2. Folatos en los alimentos

Dentro de las principales fuentes alimenticias de folatos están los cereales, frutas, jugos de frutas, vegetales de hoja, semillas de leguminosas, carne, hígado y productos de aves de corral (E. A. Cossins, 1984). Sin embargo las cantidades de folatos en los alimentos varía enormemente (Tabla 2.5), las hortalizas de hoja verde y semillas de leguminosas son ricas en folatos, pero los alimentos básicos tales como cereales, tubérculos y frutas son relativamente pobres; los cereales de maíz, de trigo y particularmente el arroz contienen cantidades extremadamente bajas (Bekaert,

et al., 2008). Una dieta basada en esos alimentos no puede satisfacer los requerimientos necesarios (Bekaert, et al., 2008) de 400  $\mu\text{g}$  equivalentes de folatos por día para los adultos y 600  $\mu\text{g}$  / día para las mujeres embarazadas (Bouis, 2002; Hanson & Gregory, 2002). Al respecto, la ingesta de folatos es muy insuficiente en los países pobres y subóptima incluso en los países ricos (de Bree, Verschuren, Blom, & Kromhout, 2001; Konings et al., 2001; Krishnaswamy & Madhavan Nair, 2001; Underwood & Smitasiri, 1999).

**Tabla 2.5** Contenido de folatos en alimentos, valores en  $\mu\text{g}$  de folatos por 100 g de peso verde. Obtenidos por método microbiológico. Adaptado de (Bekaert, et al., 2008)

Cultivo	Contenido de Folatos ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )
Arroz (Blanco, crudo)	6 – 8
Maíz (Amarillo, crudo)	19
Trigo (Blanco, crudo)	38 – 43
Tomate (Fruto, crudo)	9 – 29
Chicharos (verde, crudo)	65
Espinacas (Hoja, crudo)	194
Lentejas (semillas maduras, crudo)	433
Frijoles (semillas maduras, crudo)	463

La matriz del alimento, su estructura celular y la inestabilidad química de los folatos en el tracto gastro intestinal puede afectar la biodisponibilidad de los folatos (Seyoum & Selhub, 1998). Las formas reducidas o naturales son poco estables y son numerosos los factores que afectan su estabilidad (Ros, Bernal, Olivares, Periago, & Martínez, 2002). La unión de los folatos a proteínas ligadoras pueden protegerlos y estabilizarlos (Jones & Nixon, 2002).

El consumo de folatos está influenciado negativamente por varios métodos de cocimiento de los alimentos que pueden degradar las formas naturales de la vitamina en los alimentos (McKillop et al., 2002). La estabilidad de los folatos durante el procesamiento de los alimentos es influenciada por varios factores, entre ellos, la luz, la temperatura, el pH, el contenido de humedad y la presencia de ciertos aditivos e ingredientes (Bender, 1997; Gubler, 1991). Dada la pobre estabilidad química de los folatos naturales, las condiciones típicas de cocimiento de los alimentos pueden reducir sustancialmente los contenidos de vitaminas ingeridos (McNulty & Pentieva, 2004). Pérdidas de folatos en el rango de 50 – 80% han sido reportadas en vegetales verdes después de ser hervidos (De Souza & Eitenmiller, 1986; Hurdle, Barton, & Searles, 1968; Leichter, Landymore, & Krumdieck, 1979; McKillop, et al., 2002) y en leguminosas (Dang, Arcot, & Shrestha, 2000).

### **2.3. Enfermedades por deficiencia de folatos**

Los folatos son importantes para la síntesis del grupo metilo, la falta en su producción resulta en un aumento de los niveles de homocisteína total (tHcy) en plasma (Selhub, 1999). La

hiperhomocisteína ha sido identificada como un factor de riesgo para enfermedades vasculares (Suormala, Gamse, & Fowler, 2002).

Existe evidencia de la relación entre insuficiencia de folato y la elevación de la concentración de homocisteína, y el consiguiente riesgo de enfermedades coronarias, trombosis venosa, estenosis de la arteria carótida, y otras formas de enfermedades vasculares (Bailey, 1995; McEneny, Couston, McKibben, Young, & Woodside, 2007; Rimm, 2001; Verhoef et al., 1996).

En el año 2000 en México, la principal causa de muerte después de la diabetes mellitus era la cardiopatía isquémica y las enfermedades cardiovasculares (INSP, 2002), las estadísticas muestran un aumento en el número de muertes relacionadas con enfermedades cardiovasculares para el año 2005 las enfermedades del corazón eran la principal causa de muerte por encima de la diabetes mellitus y los tumores malignos (INEGI, 2007).

La manifestación clínica clásica de deficiencia de folatos es la anemia megaloblástica (Herbert, 1967; Hines, Halsted, Griggs, & Harris, 1968), siendo el ácido fólico el empleado para el tratamiento de dicha anemia. Las investigaciones también relacionan el bajo estatus de folatos con disfunciones neurocognitivas tales como demencia y Alzheimer (Clarke et al., 1998; Seshadri et al., 2002).

En humanos la ingesta adecuada de folatos tiene la capacidad de prevenir defectos del tubo neural, defecto severo de nacimiento. Esta importante función se da gracias a que permite aumentar el sustrato disponible para la reductasa termolábil 5,10-metileno-THF, lo cual produce

un aumento en la conversión del aminoácido homocisteína al aminoácido metionina (aminoácidos encontrados en el torrente sanguíneo), lo que a su vez reduce el riesgo de que no cierre el tubo neural.

La información sobre defectos del tubo neural en América Latina es escasa y no se dispone de registros de defectos congénitos basados en la población. Los registros indican una alta incidencia de casos de defectos de tubo neural para México (Tabla 2.6) más aun cuando se compara con países como Australia 16 por cada 10.000 nacidos (Lumley, Watson, Watson, Bower, & Dowswell, 2001), India entre 4 y 15 por cada 10.000 nacidos vivos (Rajesh & Thomas, 2001). Madres con inadecuados niveles de folato tienen un mayor riesgo de tener hijos con defectos del tubo neural o de otras formas de defectos de nacimiento (Czeizel & Dudas, 1992; Group, 1991).

**Tabla 2.6** Número de casos, por 10.000 nacidos vivos, de defectos del tubo neural en México.

Adaptado de (Hook, 1992)

	1980 - 1984	1985 - 1989	1990 - 1994	1995
Anencefalia	18,23	19,9	16,51	16,42
Espina bífida	14,78	18,7	17	8,94
Encefalocele	3,29	3,18	2,28	3,12
<b>Total</b>	<b>36,3</b>	<b>41,78</b>	<b>35,79</b>	<b>28,48</b>

El riesgo de ciertas formas de cáncer (por ejemplo, de colon, de cuello uterino y de mama) también aumenta cuando la ingesta de ácido fólico es insuficiente (Choi & Mason, 2000; Kim,

1999). Una deficiencia de folato también puede contribuir a la depresión (Fava et al., 1997; Green & Miller, 1999), a la respuesta inmune deteriorada (Green & Miller, 1999), y a los nervios y el daño neurológico (Green & Miller, 1999; Houston et al., 1999).

## **2.4. Estado Actual de las técnicas analíticas de folatos**

### 2.4.1. Análisis microbiológico

El ensayo microbiológico con el microorganismo *Lactobacillus rhamnosis (casei)* para la determinación de folatos totales en un alimento es la técnica clásica y aprobada por la Asociación Oficial de Químicos Analíticos, por sus siglas en inglés AOAC (E. A. Cossins & Chen, 1997). Sin embargo, el análisis por medio de la bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 7469) es específico para clases biológicamente activas de folato y no detecta estereoisómeros inactivos (Horne, Krumdieck, & Wagner, 1981).

La respuesta al crecimiento de *L. rhamnosus* puede variar con apenas unas decenas de unidad de pH (Takemura, Kobayashi, & Sekiguchi, 1996). Así pues, aunque adecuado para el análisis rutinario de folatos, el método microbiológico es menos práctico para el uso en laboratorios de investigación (Quinlivan, et al., 2006), ya que el método microbiológico ha sido ampliamente cuestionado por no permitir distinguir entre los diferentes clases de folatos (Freisleben, Schieberle, & Rychlik, 2003).



#### 2.4.2. Cromatografía líquida de detección electroquímica.

La detección mediante el sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ofrece ser una técnica avanzada y de gran precisión, ya que permite mayor rapidez en la detección total de folatos, además de permitir resultados individuales de las diferentes clases de folatos presentes en los alimentos, esto a diferencia del método microbiológico (Quinlivan, et al., 2006).

Los folatos son los compuestos ideales para la detección electroquímica ya que los grupos constituyentes de la molécula pteridinas son fácilmente oxidados. Por otra parte, las clases de folato tienen el potencial de oxidación (Kohashi, Inoue, Sotobayashi, & Iwai, 1986), debido a las diferencias en el estado oxidativo y de sustitución de 1-carbono de la molécula pteridinas y, por lo tanto, son fácilmente distinguibles.

Lo mismo que con la detección por UV, las diferentes clases de folato tienen propiedades electroquímicas (Bagley & Selhub, 2000), que son independientes de la longitud de la cadena de glutamato. En consecuencia, es posible cuantificar las clases de folatos presentes en las muestras biológicas (Bagley & Selhub, 1998, 2000), sobre la base de su perfil de elución y características electroquímicas

Para cada analito, en la ausencia de compuestos que causen interferencias, el radio de respuesta a través de los electrodos se mantiene constante y es independiente de la concentración. Por tanto información cuantitativa puede ser derivada de las señales (Bagley & Selhub, 2000).

#### 2.4.3. Cromatografía líquida de detección por fluorescencia.

Bajo condiciones ácidas, la mayoría de los folatos reducidos son fluorescentes (Tani & Iwai, 1983). Sin embargo el uso de cromatografía líquida con detector de fluorescencia (LC-FD) ha sido limitado dadas las limitaciones tecnológicas de usar una longitud de onda fija. Pero algunas clases de folatos exhiben poca o ninguna emisión al valor de mayor fluorescencia de 5-CH<sub>3</sub>-THF (358 nm) (M. D. Lucock et al., 1995), teniendo mayor intensidad de emisión a otra longitud de onda.

#### 2.4.4. Cromatografía líquida acoplada a masas LC-MS

LC-MS es una herramienta analítica muy sensible (Garbis, Melse-Boonstra, West, & van Breemen, 2001; Pawlosky & Flanagan, 2001). Sin embargo, LC-MS sólo utiliza dos modos de selección: la separación cromatográfica y la proporción masa-a-carga (m/z) de los componentes ionizados. Los folatos son normalmente analizados en el modo ionización positivo debido a que la fase ácida suprime la formación de moléculas desprotonadas en el modo de ionización negativa, dando una respuesta más baja que en el modo de ionización positiva, sin embargo, la aparición de aductos de sodio y potasio de los analitos (Garbis, et al., 2001), puede complicar su análisis generando sobreestimación de la concentraciones de folatos (Nelson, Dalluge, & Margolis, 2001).

## 2.5. Características del proceso de extracción

### 2.5.1. Antioxidantes

Durante el proceso de extracción de los folatos de cualquier matriz, la mayoría de las veces, es necesario incluir antioxidantes en el buffer de extracción, independientemente del método de extracción y deconjugación utilizados. Los antioxidantes no solamente ayudan a proteger a los folatos contra las pérdidas de folatos, envolviendo principalmente la escisión oxidativa de la unión entre el C9-N10, también preservan el nivel de reducción del anillo de pteridina. El ascorbato (1-5%, p/v) es ampliamente utilizado, también en combinación con  $\beta$ -mercaptoetanol el cual estabiliza la mayor parte de los folatos antes de iniciar el tratamiento térmico (Lucock, Green, Hartley, & Levene, 1993; Pfeiffer, Rogers, & Gregory III, 1997) o ditioneitol (Lucock, et al., 1993). Purgar los tubos con nitrógeno para remover el oxígeno y utilizar luz amarilla para limitar la fotodegradación ayuda a minimizar la pérdida de folatos (Quinlivan, Hanson, & Gregory, 2006).

### 2.5.2. Extracción de muestras

La mayor debilidad de la mayoría de estudios es la dificultad en determinar la eficiencia de un determinado método de extracción. La mayoría de los estudios se basan en un sustituto de medición tal como la recuperación de ácido fólico añadido (Quinlivan, et al., 2006). Ninguno de estos enfoques proporciona información sobre cuánto ácido fólico sigue siendo atrapado por la matriz de la muestra o cuánto se ha perdido debido a la inestabilidad. La baja eficiencia de

extracción producirá una subestimación de los contenidos en folatos y puede dar una errónea distribución de ácido fólico (Quinlivan, et al., 2006).

El tratamiento con calor es usado ampliamente ya que contribuye a la lisis celular y a desnaturalizar proteínas, liberando folatos ligados, sin embargo, puede causar degradación de folatos lábiles, especialmente bajo condiciones ácidas (Quinlivan, McPartlin, Weir, & Scott, 2000), disminuyendo así la concentración de folatos (Dang, Arcot, & Shrestha, 2000). El uso de proteasa y  $\alpha$ -amilasa permite una mayor extracción de folatos atrapados cuando las matrices son muy altas en contenido de proteínas o carbohidratos (Hyun & Tamura, 2005).

### 2.5.3. Deconjugación

Para el proceso de deconjugación se ha utilizado la enzima pteroilpoli-y-glutamylcarboxipeptidasa también conocida como hidrolasa de folatos o conjugasa. Las tres principales fuentes utilizadas tradicionalmente han sido riñón de cerdo, páncreas de gallina y plasma de rata (Bird, Robbins, Vandenbelt, & Pfiffner, 1946; Engelhardt & Gregory III, 1990; Laskowski, Mims, & Day, 1945), pero también se ha usado plasma humano (Quinlivan, et al., 2006), sin embargo, su eficiencia no siempre es del 100%. En el caso de la conjugasa de plasma de rata, de páncreas de gallina y de riñón de cerdo son inhibidas en una larga variedad de frijoles (Krumdieck, Newman, & Butterworth, 1973).

Sin embargo, el pH óptimo para riñón de cerdo y para plasma humano es de aproximadamente de 4.5 a estas condiciones casi todo el 10-CHO-THF es convertido a 5,10-CH=THF y si el pH baja hasta 4 el 5,10-CH=THF se puede hidrolizar a 5-CHO-THF (Quinlivan, et al., 2006). Las

interconversiones por el uso de estas conjugasas dificultan la cuantificación de las diferentes especies de folatos presentes originalmente en las muestras.

Otro inconveniente es que componentes en los alimentos inhiben la actividad de las conjugasas animales, en particular se sospecha de concentraciones fisiológicas de aniones orgánicos como el citrato, malato y ascorbato (Engelhardt & Gregory III, 1990). La eficiencia con la que los folatos son deconjugados puede depender de la especie de folatos presentes, la matriz de la muestra, el pH del tratamiento y de la fuente de pteroilpoli-y-glutamylcarboxipeptidasa (Quinlivan, et al., 2006).

En estudios en chícharo (*P. sativum*), soya (*Glycine max*), habichuelas (*Phaseolus vulgaris*), black-eyed peas (*Vigna unguiculata*) y en cacahuete (*Arachis hypogaea*) (Rychlik, Englert, Kapfer, & Kirchhoff, 2007), la conjugasa de plasma de rata mostró únicamente 42% de actividad y la adición de mayor contenido de plasma de rata no aumento significativamente el rendimiento por lo que debió añadirse conjugasa de páncreas de gallina, el cual solamente degrada poliglutamatos hasta formas diglutamiladas (Keagy, 1985) por lo que se debió mantener el uso del plasma de rata. Sin embargo dicha mezcla no fue efectiva en lentejas (*Lens culinares*) al presentar solo 45% de actividad y el aumento de la dosis no aumento significativamente el rendimiento a monoglutamatos. Una alternativa utilizada para remover los inhibidores presentes en la matriz vegetal es pasar la muestra por cartuchos de extracción en fase sólida cargados con aminas cuaternarias fuertes (Rychlik, et al., 2007). Hasta el momento no se ha identificado el ó los compuestos en frijol responsables de la inhibición de las deconjugasas animales, se han propuesto ácidos orgánicos tales como el ácido cítrico (Wei & Gregory, 1998), sin embargo,

cuando se ha usando extracción en fase sólida se ha logrado la remoción del inhibidor mientras que el ácido cítrico de la muestra solo ha disminuido en un 16% (Rychlik, et al., 2007).

## 2.6. $\gamma$ -Glutamil hidrolasa vegetal

La  $\gamma$ -Glutamil hidrolasa vegetal (GGH, EC 3.4.19.9), cataliza la escisión de la cola de glutamatos en los folatos. Las plantas normalmente tienen uno o varios genes GGH; *Arabidopsis thaliana* tiene tres, dispuestos en tándem en el cromosoma 1, estos tienen un ~35% de identidad al GGH humano. Las  $\gamma$ -Glutamil hidrolasa de *Arabidopsis* comparten muchas características con las correspondientes en mamíferos, incluyendo un péptido señal predicho para la ruta de secreción (Bendtsen, Nielsen, von-Heijne, & Brunak, 2004), por lo menos un motivo de N-glicosilación (Galivan et al., 2000), y residuos conservados de histidina y cisteína que son esenciales catalíticamente en GGh humanos, así como otros seis residuos conservados que pueden contribuir a la catálisis o la unión del sustrato (Chave, Auger, Galivan, & Ryan, 2000; Li, Ryan, Chave, & Van Roey, 2002). La secuencia AtGGH3 parece ser única para plantas porque presenta dos pequeñas inserciones cerca a la N-terminal que no se encuentra en ninguna de las secuencias disponibles de GGH de plantas y tampoco tiene contraparte clara en GGH de mamíferos (Orsomando et al., 2005). Como las GGH de los mamíferos las enzimas AtGGH1 y AtGGH2 de *Arabidopsis* son dímeros de ~300 residuos de polipeptidos, tienen pH óptimo ligeramente ácido, y presentan diferentes patrones de escisión de glutamatos a pesar de tener secuencias de aminoácidos similares. Ambas enzimas presentan acción endopeptidasa, AtGGH2 también presenta acción exopeptidasa y transpeptidasa (Orsomando, et al., 2005).

Para la presente investigación se utilizó la AtGGH1 y la AtGGH2 clonadas de *Arabidopsis* (Orsomando, et al., 2005). Ambas enzimas actúan como dímeros, presentan bajos valores de Km (0,5 – 2  $\mu$ M) para folil y pentaglutamatos, y actúan como endopeptidasas. Ambas tiene una identidad del 80% en su secuencia, sin embargo, ellas se diferencian en que AtGGH1 escinde pentaglutamatos principalmente a di y triglutamatos, mientras que AtGGH2 escinde principalmente a monoglutamatos (Orsomando, et al., 2005).

El uso de AtGGH1 y AtGGH2 en deglutamilación hasta folatos mono-glutamados es una buena opción dado que solo AtGGH2 ataca diglutamatos, mientras que AtGGH1 escinde principalmente a diglutamatos,

Otra ventaja de la  $\gamma$ -Glutamyl hidrolasa vegetal es la menor cantidad de proteínas necesaria en el proceso de deconjugación en comparación con las conjugasas animales, ya que las AtGGH1 y AtGGH2 recombinantes pueden ser expresadas en *Escherichia coli* y purificadas por cromatografía de afinidad, obteniendo de esta manera una enzima concentrada y específica que se puede aplicar al buffer de extracción en pequeñas cantidades, en cambio las conjugasas animales utilizadas actualmente provienen de extractos de tejidos siendo entonces una mezcla de proteínas en las que la conjugasa está en un bajo porcentaje. De esta manera es necesario añadir una gran cantidad proteica al extracto; por ejemplo el plasma de rata dializado se utiliza en 1mL por cada 0.5-1.0 g de segmento de fruta (Diaz de la Garza et al., 2004). Además si en la matriz de la muestra se encuentra algún inhibidor de la conjugasa su efecto se supera tradicionalmente colocando una mayor cantidad o aumentando el tiempo de la incubación, y a mayor tiempo de incubación mayor oportunidad de degradación de folatos.

## 2.7. Características de la purificación de muestras

### 2.7.1. Columnas ligadoras de folatos

Las columnas ligadoras de folatos consisten en proteínas ligadoras de folatos (FBP) unidas covalentemente a un soporte sólido, usualmente agarosa (Sepharosa) (Selhub, Ahmad, & Rosenberg, 1980). Las columnas ligadoras de folatos no están disponibles comercialmente; sin embargo existe el protocolo para su preparación (Selhub, et al., 1980). El aislamiento de FBP a partir de suero de leche en polvo es laborioso cuando se efectúan sobre una escala preparativa. Los rendimientos de aproximadamente 100 mg de proteína purificada obtenida por esta vía permite la preparación de varias columnas de afinidad (Quinlivan, et al., 2006).

El ácido fólico es usualmente utilizado para determinar la capacidad ligadora de las columnas, pero no todos los folatos se unen con afinidad equivalente. Por lo tanto la columna ligadora de folatos es cargada hasta un 30% de su capacidad (Fazili & Pfeiffer, 2004; Kariluoto, Vahteristo, & Piironen, 2001; Selhub, 1989), de la capacidad máxima de ligación de la columna para permitir la recuperación uniforme de varias clases de folatos.

La FBP tiene una alta afinidad por los folatos a valores de pH cercanos a 7 pero virtualmente ninguno a pH 3.5 (Lyngbye, Hansen, & Holm, 1980). Por lo que las muestras generalmente son cargadas en la columna bajo condiciones neutras (Kok et al., 2004) o ligeramente básicas (Nelson, Pfeiffer, Margolis, & Nelson, 2003) y son eluidas con un buffer ácido (Chang & Gage, 2003; Hart et al., 2002; Nelson, et al., 2003).



Las muestras deben ser desproteinizadas antes de ser aplicadas en la columna ligadora de folatos, porque las proteínas en la muestra pueden secuestrar folatos (Nelson, et al., 2003) y reducir la unión.

## **2.8. Situación del frijol en México**

Del género *Phaseolus* que incluye aproximadamente 35 especies; 4 especies son las que se cultivan: *P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. lunatus* y *P. acutifolius*. Se estima que el cultivo anual *P. vulgaris* ha sido domesticado México y Centro América desde hace 6,000 años (Delgado, Bonet, & Gepts, 1988; Kaplan, 1981).

En México la cuarta parte de la población depende de la producción agropecuaria y esta aporta alrededor del 4 por ciento al Producto Interno Bruto (SAGARPA, 2007). Uno de los cultivos estratégicos para el desarrollo rural de México, es el frijol y lo es debido al área dedicada a su producción, la cual en el 2005 ascendía a 1´476.020 hectáreas, correspondiendo al cultivo con la tercer mayor área sembrada, de un total de 21´640.072 hectáreas sembradas en el territorio nacional (INEGI, 2006). Se estima que el 67% de la producción proviene de pequeñas granjas (<5 ha) (Broughton et al., 2003).

El segundo factor que hace del frijol un cultivo estratégico para el desarrollo rural de México es que, es un importante generador de empleo particularmente para la economía del sector rural. Para el 2004 se estimaba en 78 millones de jornales, calculados mediante un modelo de costo de

producción promedio que demanda 35 jornales por hectárea, lo que equivale a 382.029 empleos permanentes en el sector rural (Serrano, 2004).

Durante los primeros años del siglo XXI en México los principales estados productores de Frijol fueron Zacatecas, Durango, Chihuahua, Sinaloa, Nayarit, Guanajuato, Chiapas, San Luis Potosí y Puebla (Serrano, 2004). Para el 2007 se calculaba que el 60% de toda la producción provenía de 5 estados, Zacatecas (30.6%), Sinaloa (12.5%), Durango (11.5%) y Nayarit (5.0%). El mayor productor fuera de esta zona es el estado de Chiapas, al sur del país, que representa 6.4% del total de la producción (SAGARPA, 2007). La producción de frijol en México se puede clasificar en tres principales categorías: negro (39% de la producción), claro (48% de la producción) y pinto (12% de la producción) (World-Bank, 2007). La demanda es casi universal e incluye diversas clases de frijol, con excepción de las regiones del trópico húmedo donde se tiene preferencias por los frijoles negros pequeños y opacos y de la región pacífico norte donde se prefiere los frijoles tipo peruano (Acosta & Perez, 2003).

El consumo de esta leguminosa ocupa un lugar importante dentro de la dieta de la población nacional de los estratos sociales de menores ingresos, tanto de la ciudad como del campo, por ser uno de los cultivos con más proteínas de origen vegetal (SAGARPA, 2007), lo que constituye el tercer factor para considerarlo como cultivo estratégico para el desarrollo rural de México, otra ventaja que ofrece el frijol es que presenta altos contenidos de folatos (Tabla 2.7).

Se estima que el frijol en poblaciones del oriente y sur-oriental de África es la segunda fuente más importante de proteína y la tercera más importante fuente de calorías (Broughton, et al.,

2003), en Brasil es la principal fuente de proteínas y carbohidratos así como de minerales como Fe (Lott, Ockenden, Raboy, & Batten, 2000). El frijol provee en la dieta proteínas que juegan un rol esencial en la nutrición humana por complementación de otros alimentos que son fuentes primarias de carbohidratos. El frijol contiene entre 20 y 25% de proteínas, muchas de las cuales son almacenadas como faseolina (Ma & Bliss, 1978). Al igual que otras proteínas presentes en semillas de la familia de las leguminosas, la faseolina es deficiente en contenido de azufre esencial para aminoácidos como la metionina. Sin embargo, las proteínas de las semillas de cereales suelen contener suficientes ácidos aminados sulfurilo, por lo que el consumo combinado de cereales y leguminosas en general, alivia estas deficiencias garantizando una dieta equilibrada (Broughton, et al., 2003). La alta calidad nutricional de los granos en términos de porcentaje de proteínas y minerales, especialmente hierro y zinc, los hace un alimento indispensable en las regiones donde hay una alta prevalencia de deficiencias de micronutrientes (Broughton, et al., 2003).

#### 2.8.1. El frijol y la simbiosis con *Rhizobium*

El nitrógeno ( $N_2$ ) es el nutriente que más limita el desarrollo de una gran cantidad de plantas en muchos ambientes (Bohloul, Ladha, Garrity, & George, 1992). El  $N_2$  es requerido para la síntesis de amino ácidos, así como precursor de otros compuestos, también es componente esencial de ácidos nucleicos, cofactores, metabolitos y es el componente principal de la clorofila, las plantas sintetizan diversos compuestos secundarios de nitrógeno como alcaloides (Crawford, Kahn, & Long, 2001). El nitrógeno terrestre es sujeto a un rápido intercambio y es eventualmente perdido como gas  $N_2$  en la atmósfera (Crawford, et al., 2001).

La asociación simbiótica con microorganismos fijadores de nitrógeno es quizás la mayor fuente de nitrógeno para las plantas leguminosas, especialmente donde el nitrógeno está severamente limitado para el desarrollo de las plantas. En ecosistemas naturales terrestres, 80% al 90% del nitrógeno disponible para las plantas se estima que se origina a partir de fijación biológica (Crawford, et al., 2001). De ese total, aproximadamente el 80% es generado en asociaciones simbióticas. De esta forma la simbiosis es importante para la agricultura porque permite disminuir los costos asociados con el uso de fertilizantes.

El termino *Rhizobia* se utiliza para referirse a las bacterias que reducen nitrógeno atmosférico a amonio en asociación simbiótica con un hospedero compatible y que juega un importante rol en el suelo (Crawford, et al., 2001). Estas se diferencian a bacterioides y tienen la capacidad de fijar nitrógeno a amonio cuando ciertos compuestos son intercambiados entre la planta y el bacteroide (Dilworth & Glenn, 1991; Dixon & Paiva, 1995; Patriarca, Tate, & Iaccarino, 2002). El establecimiento de una efectiva simbiosis de fijación de nitrógeno entre la planta y la bacteria es un proceso complejo cuyo entendimiento constituye un interesante reto científico con claras implicaciones en el desarrollo de las plantas y las ciencias de la agricultura (McNeill & Winiwarter, 2004). Los organismos fijadores de nitrógeno más eficientes establecen simbiosis con plantas, en donde la energía para la fijación de nitrógeno y el sistema de protección contra el oxígeno es proveído por la planta asociada (Mylona, Pawlowski, & Bisseling, 1995).

Pocas especies de plantas tienen la habilidad de interactuar simbióticamente con bacterias del género *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium* (conocidas como *rhizobia*) (Long, 1996; Mylona, et al., 1995). Entre las que sí establecen simbiosis se encuentran más de

3000 especies de la familia *Fabaceae*, conocidas como leguminosas. La familia *Fabaceae* está compuesta por tres subfamilias (*Caesalpinioideae*, *Mimosoideae*, y *Papilionoideae*) cada una de las cuales contiene géneros capaces de formar nódulos. *Parasponia* es la única especie no leguminosa capaz de establecer asociación simbiótica con *Rhizobium*.

Bacterias del orden *Rhizobiales* como *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium* establecen simbiosis de fijación de nitrógeno con las raíces de plantas leguminosas (Flores et al., 2005).

*R. etli* anteriormente conocida como *Rhizobium leguminosarum phaseoli* (Segovia, Young, & Martinez-Romero, 1993), es caracterizada por la capacidad de establecer una simbiosis efectiva con plantas de frijol, aunque el frijol puede establecer simbiosis con al menos dos tipos de especies diferentes de *Rhizobium* (Martinez-Romero et al., 1991; Segovia, et al., 1993). Los rizobios que nodulan frijol, se reunían en un solo grupo denominado *R. leguminosarum biov. phaseoli*, pero con otros criterios de diferenciación, se demostró gran heterogeneidad al interior de tal grupo. Las cepas noduladoras de frijol han sido clasificadas como cepas tipos I y II. El grupo I fue propuesto como *R. etli*. (Martinez-Romero, et al., 1991; Segovia, et al., 1993; Soberon-Chavez, Najera, Espin, & Moreno, 1991). El grupo II ha sido propuesto como una nueva especie, *R. tropici*. Algunas cepas pertenecientes a *R. fredii* y *Sinorhizobium* nodulan frijol y soya (Graham, 1981; Sadowsky, Cregan, & Keyser, 1988). Ha sido reportada una cepa aislada de alfalfa en Oregón, U.S.A., capaz de nodular también frijol, y que no correspondería a ninguna de las clasificaciones ya nombradas (Eardly, Young, & Selander, 1992).

La mayoría de los nódulos estudiados son de dos tipos, indeterminados y elongados (*Medicago sativa*, *P. sativum* y *Vicia hirsuta*) y determinados y globosos (*Glycine max* y *P. vulgaris*). Los nódulos determinados son globosos porque se desarrollan desde un meristemo esférico que no es evidente en los nódulos maduros (Patriarca, et al., 2002). En observaciones histológicas se aprecia un tejido periférico y central (Mylona, et al., 1995; Nap & Bisseling, 1990).

La fijación simbiótica de nitrógeno en frijol común es considerablemente baja (Pereira & Bliss, 1987) en comparación con otras leguminosas (Tabla 2.7). Excepto por *R. leguminosarum* (Baev et al., 1992), la inducción de la transcripción del gen nod mediada por flavonoides es abolida en presencia de  $\text{NH}_4^+$ , que parece actuar a través de la asimilación de los productos (Dusha & Kondorosi, 1993; Mendoza, Leija, Martinez-Romero, Hernandez, & Mora, 1995; Wang & Stacey, 1990).

### 2.8.2. Proceso de infección de *Rhizobium*

*Rhizobium* se diferencia de otras especies a nivel molecular por la presencia reiterativa del gen estructural de la nitrogenasa reductasa, por la organización común de los genes de nodulación en dos unidades transcripcionales teniendo nod4 nodBC, la presencia del gen inhibidor de polisacáridos, psi, y la secuencia de DNA 16s. (Segovia, et al., 1993).

*R. etli* es una bacteria aeróbica, gram negativa, cuando es crecida en medio YM las colonias son circulares, convexas, translucidas y húmedas usualmente de 2 a 4 mm de diámetro después de 2 – 4 días. Es capaz de crecer en medio mínimo conteniendo malato como fuente de carbono, pero

no con arginina, hipoxantina o sorbitol como fuente de carbono. La máxima temperatura de crecimiento es 35°C. Todas las cepas son resistentes al ácido nalidíxico (Segovia, et al., 1993).

**Tabla 2.7** Fijación simbiótica de N<sub>2</sub> por algunos cultivos de leguminosas<sup>1</sup> y especies nativas en sus ambientes naturales en Brazil<sup>2</sup> Adaptado de <sup>1</sup>Gault et al., 1995, <sup>2</sup> Sprent et al., 1996

Especie	N <sub>2</sub> fijado (Kg/ha)	N absorbido por la planta (%)
<i>Medicago sativa</i>	440-780	65-96
<i>Glycine max</i>	120	53
<i>Lotus corniculatus</i>	92	55
<i>Lupinus angustifolius</i>	170	65
<i>Medicago sativa</i>	180	70
<i>Phaseolus vulgaris</i>	65	40
<i>Pisum sativum</i>	72	35
<i>Trifolium pratense</i>	150	59
<i>Vicia faba</i>	151	Nd
<i>Vigna angularis</i>	80	70

Se reporta que los genes de nitrogenasa son inducidos únicamente entre el 10 al 13 día después de la inoculación en las raíces de frijol (Valderrama, Davalos, Girard, Morett, & Mora, 1996), la nodulación es inducida por *R. etli* en ambientes privados de nitrógeno reducido (Mendoza, Valderrama, Leija, & Mora, 1998).

La fijación de nitrógeno en *Rhizobium* es una compleja relación simbiótica entre la planta y la bacteria orquestada por las redes genéticas y metabólicas de ambos organismos (Dixon & Paiva,

1995). En general la planta supe fuentes de carbono y glutamato al bacteroide, mientras que el bacteroide en cambio provee a la planta con amonio, aspartato y alanina (Lodwig & Poole, 2003; Prell & Poole, 2006). El intercambio de estos compuestos crea una relación de dependencia simbiótica entre ambos organismos cuya efectividad es esencial para permitir el desarrollo de la planta y la supervivencia de la bacteria. La fijación de nitrógeno ocurre en el último de los tres estados de desarrollo.

El primer estado de desarrollo está relacionado con el proceso de infección de las raíces de la planta por *Rhizobium*. Este empieza con la excreción de compuestos fenólicos específicos (flavonoides: flavonas, flavononas o isoflavonas) y betaínas por parte de la raíz de las leguminosas (Phillips, Dakora, Sande, Joseph, & Zon, 1994), los que actúan como señales para la formación de nódulos (Patriarca, et al., 2002). Las bacterias fijadoras de nitrógeno pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, y *Azorhizobium* viven alrededor de una amplia variedad de sustancias orgánicas liberadas por semillas en germinación y por las raíces de las plantas, incluyendo compuestos polifenólicos, algunos de los flavonoides liberados por las semillas de las leguminosas y las raíces inducen la transcripción del gen de nodulación rhizobial (nod, noe y nol), y la producción de lipocitooligosacaridos llamados factores NOD los cuales permiten a la bacteria el establecimiento de una asociación simbiótica con la planta huésped (Broughton, Jabbouri, & Perret, 2000; Hungria, Joseph, & Phillips, 1991).

Seguido a la liberación de flavonoides por la planta y a los factores nod por *Rhizobium*, la bacteria se multiplica rápidamente en la rizósfera. La bacteria se adhiere a los pelos radiculares y afectan solo a las que han dejado de crecer. La pared celular de las afectadas son parcialmente



hidrolizadas en la punta, de esta manera se permite el acceso de la bacteria y la infección se inicia por invaginación de la pared celular, la infección crece dentro del pelo radicular a una tasa de 7 a 10  $\mu\text{m h}^{-1}$  y provee un conducto para que la bacteria alcance el cortex de la raíz (Crawford, et al., 2001).

Si la infección tiene lugar, se activan genes específicos entre el cortex y el periciclo, lo cual permite la formación de un túnel de infección a través del cual la bacteria entra. La división celular empieza en el interior del cortex, opuesto a los polos del protoxilema, de manera que se forma un nuevo meristemo debido a la presencia de *Rhizobium*. Este meristemo da lugar al nódulo radicular. El túnel de infección crece hasta que finalmente la bacteria alcanza el citoplasma de las células de parénquima al centro del nódulo en desarrollo. Al interior de las células de la planta anfitrión la bacteria continúa dividiéndose por algún tiempo, ahora diferenciándose a bacteroides. En la mayoría de las leguminosas los bacteroides son encerrados dentro de una membrana peribacteroide para formar un simbiosoma (Whitehead & Day, 1997).

Cada célula infectada puede contener cientos de simbiosomas. La membrana del simbiosoma es originada a partir de invaginación y endocitosis de la membrana de la célula cortical infectada. Esta membrana actúa como una barrera permeable selectiva para el intercambio de metabolitos entre el bacteroide y el citosol de la célula infectada (Crawford, et al., 2001).

El segundo estado de desarrollo está caracterizado por el crecimiento de la bacteria dentro de la planta y la construcción de un compartimento de estructura globular, llamado nódulo.

El patrón de expresión génica en las células huésped que son parte del nódulo es alterada por la presencia de la bacteria, resultando en la síntesis de más de 30 diferentes proteínas conocidas como nodulinas, entre ellas formas específicas de las enzimas uricasa, glutamina sintetasa y sucrosa sintetasa (Lambers, Chapin III, & Pons, 1998), y la acarreadora de O<sub>2</sub> leghemoglobina que garantiza un abastecimiento rápido de oxígeno para la alta actividad del proceso respiratorio en la planta y en el compartimento del bacteroide, mientras mantiene una baja concentración del oxígeno libre (entre 3 y 30nM), del total de la proteína soluble en el nódulo el 35% está compuesta por leghemoglobina la cual es codificada por el DNA de la planta (Lambers, et al., 1998) en respuesta a la enzima que favorece su síntesis y que es producida por *Rhizobium* (Crawford, et al., 2001), lo anterior es de vital importancia dado que la nitrogenasa, que es la enzima responsable de la fijación de N<sub>2</sub> a NH<sub>3</sub> es rápidamente dañada por el oxígeno libre (Lodwig & Poole, 2003).

Finalmente el último estado envuelve la diferenciación de la bacteria a un bacteroide, simbionte endocelular que no se divide y que a través de la inducción del complejo nitrogenasa es capaz de reducir nitrógeno atmosférico N<sub>2</sub> a NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, dentro del nódulo (Cosseau, Garnerone, & Batut, 2002), los genes de nitrogenasa son inducidos únicamente entre el 10 al 13 día después de la inoculación en las raíces de frijol (Valderrama, et al., 1996) solamente en ambientes privados de nitrógeno reducido, para el caso de *R. etli* (Mendoza, et al., 1998).

La planta provee de carbohidratos a los bacteroides, estos son suplidos a través del floema, donde son rápidamente convertidos en el compartimento de la planta a ácidos di carboxílicos

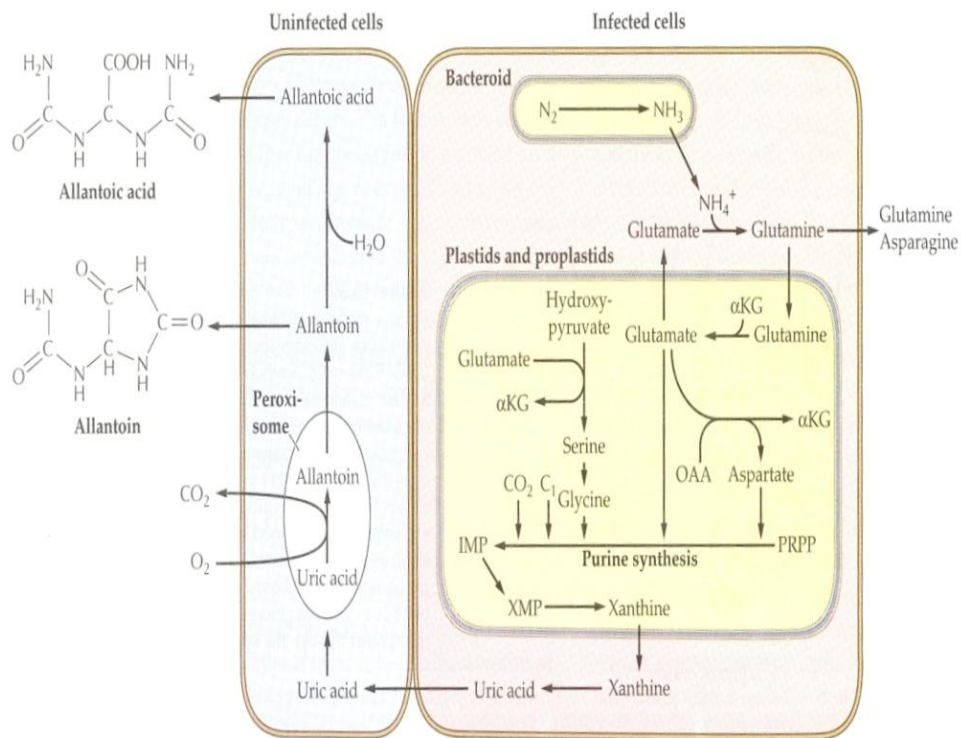
(malato, succinato), predominantemente en las células no infectadas de los nódulos (Udvardi & Day, 1997).

Un grupo de leguminosas, entre ellas el frijol, conocidas como leguminosas de tipo ureido, transporta el nitrógeno fijado por *Rhizobium* desde los nódulos al resto de la planta a través del xilema como glutamina, asparragina y principalmente como ureidos, alantoína y ácido alantoico (Figura 2.5), estos dos últimos compuestos son producidos en células vecinas no infectadas a donde las células infectadas exportan ácido úrico, un producto de descomposición de purinas, el cual es degradado y luego es enviado al resto de la planta (Rolfe & Gresshoff, 1988). El resto de las leguminosas, exportan el amonio desde los nódulos como amidas, en forma de los aminoácidos glutamina y asparragina (Crawford, et al., 2001).

En las hojas de las plantas noduladas, las ureidas son degradadas para liberar amonio, el cual luego es asimilado por glutamina sintetasa y ferredoxina dependiente de la glutamato sintetasa. El catabolismo de las ureidas en las hojas libera el nitrógeno directamente de la alantoina por medio de la alantoina amidohidrolasa, en lugar de generar primero urea y luego degradarla por la vía de la actividad de la ureasa (Crawford, et al., 2001).

Muchas plantas dedican una porción significativa de sus reservas de carbón y energía, para adquirir y asimilar el nitrógeno que necesitan. Debido a que todos los ácidos orgánicos requeridos para la fijación simbiótica de nitrógeno por *Rhizobium* y para el mantenimiento de los nódulos de las raíces provienen de la planta, el sistema simbiótico envuelve un costo para las plantas. Esos costos exceden los requeridos para la asimilación de nitrato o amonio. En un

estudio realizado en la simbiosis del Trébol con *Rhizobium* los costos de fijación de  $N_2$  fueron del 25% del carbono fijado por la fotosíntesis diaria, en cambio cuando las plantas crecen bajo disposición óptima de nutrientes las plantas emplean del 4 al 13% (Crawford, et al., 2001). La obtención de nitrógeno a través de simbiosis consume de 12 a 17 grs de carbohidratos por gramo de  $N_2$  fijado. Ese alto costo energético es regulado por las leguminosas por medio de un mecanismo para suprimir la formación de nódulos y su función si el nitrato o amonio se encuentran disponibles como fuentes de nitrógeno.



**Figura 2.5** Forma de transporte del nitrógeno fijado por los bacteroides al resto de la planta en leguminosas con transporte de tipo ureido. Tomado de (Crawford, et al., 2001).

## Capítulo III. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Crecimiento de las plantas y tratamientos

Semillas de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.), proporcionadas en el año 2008 por la Dra. Georgina Hernández (Centro de Ciencias Genómicas, UNAM, México), fueron esterilizadas superficialmente en 10% de hipoclorito de sodio comercial por 10 minutos y después fueron lavadas con abundante agua bidestilada estéril. Se realizaron tres tratamientos diferentes.

1. Inoculación con *R. etli* y riego con solución nutritiva libre de nitrógeno.
2. Sin inoculación y riego con solución nutritiva libre de nitrógeno.
3. Sin inoculación y riego con solución nutritiva completa.

En el primer tratamiento 63 semillas de frijol fueron inoculadas con *R. etli* comercial, siguiendo protocolo adaptado del proveedor (Biofábrica siglo XXI), consistente en disolver 12 mg del adherente (carboximetilcelulosa) en 1.12 mL de agua bidestilada, dejar reposar por 2 horas, mezclar las semillas con la solución y luego mezclar con 285 mg de la presentación comercial de *R. etli* (bacterias de *R. etli* 50%, turba esterilizada 37.5%, carbonato de calcio 12.5%),

Las semillas de los tres (3) diferentes tratamientos se germinaron en toallas de papel estéril húmedo por separado. Después del tercer día se sembraron en vermiculita esterilizada por autoclave (15 min., 121°C, 15psi) de a seis (6) semillas de cada tratamiento por maceta de 6", y

se crecieron en ambiente controlado a 12 horas de fotoperiodo a 23°C día/noche, con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de 2000 lumen m<sup>-2</sup>. El riego se realizó a diario con agua bidestilada, desde el trasplante a vermiculita hasta el día 16 (Gutierrez, 2009) a partir del día 16 y cada cuarto día el riego se hizo con 250 mL de solución nutritiva Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950) libre de nitrógeno por maceta., para el primer y segundo tratamiento, para el tercer tratamiento se regó con solución nutritiva Hoagland (Tabla 3.2) (Hoagland & Arnon, 1950).

**Tabla 3.1** Composición de solución nutritiva Hoagland libre de nitrógeno, ajustada a pH 5.8 (Hoagland & Arnon, 1950).

<b>Sustancia</b>	<b>Concentración</b>
Sulfato de potasio	0.0025 M
Cloruro de calcio	0.005 M
Fosfato de potasio	0.0005 M
Sulfato de magnesio	0.001 M
EDTA hierro	0.0001 M
Ácido bórico	4.6 10 <sup>-5</sup> M
Cloruro de Magnesio	9 10 <sup>-6</sup> M
Sulfato de Zinc	7.65 10 <sup>-7</sup> M
Sulfato de cobre	3.2 10 <sup>-7</sup> M
Ácido molíbdico	1.11 10 <sup>-7</sup> M
Cloruro de cobalto	1 10 <sup>-6</sup> ppm

Se utilizó vermiculita debido a que es un material inorgánico, no abrasivo, con alta capacidad de intercambio catiónico, aéreo y retención de humedad. También aísla y minimiza los cambios de temperatura (Mendoza, Valderrama, Leija, & Mora, 1998).

**Tabla 3.2** Composición de solución nutritiva Hoagland, ajustada a pH 5.8 (Hoagland & Arnon, 1950).

<b>Sustancia</b>	<b>Concentración</b>
Nitrato de potasio	0.005 M
Nitrato de calcio	0.005 M
Fosfato de potasio	0.001 M
Sulfato de magnesio	0.002 M
EDTA hierro	0.0001 M
Ácido bórico	$4.6 \cdot 10^{-5}$ M
Cloruro de Magnesio	$9 \cdot 10^{-6}$ M
Sulfato de Zinc	$7.65 \cdot 10^{-7}$ M
Sulfato de cobre	$3.2 \cdot 10^{-7}$ M
Ácido molíbdico	$1.11 \cdot 10^{-7}$ M

Grupos de 6 plantas fueron cosechadas los días 0, 3, 7, 10, 14 y 26 después de iniciar la imbibición, las plantas fueron lavadas con agua para retirarles la vermiculita y fueron divididas en embrión y cotiledón el tercer día, y en raíz, hipocótilo, cotiledón, epicótilo y hojas los demás días. Las muestras de cada tejido, de las seis plantas para cada tratamiento, se congelaron rápidamente sumergiéndose en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Las fechas de muestreo se escogieron cercanas entre ellas para hacer seguimiento a los cambios presentados y el último día se escogió por estar en el rango en el que se han medido concentraciones de

nitrogenasa en frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.), inoculado con *R. etli* (Peralta et al., 2004),

### **3.2. Confirmación de infección por *Rhizobium***

*Rhizobium* puede ser descrito de acuerdo con su crecimiento en medio sólido y líquido. El tamaño, forma, color y textura de las colonias y la habilidad de alterar el pH del medio son características estables utilizadas en la definición de la cepa aislada (Somasegaran & Hobben, 1985).

Se colectaron nódulos de las raíces de las plantas muestreadas (Figura 3.1), cortando la raíz a 0,5 cm de cada lado del nódulo, para ello se utilizaron pinzas para evitar dañar los nódulos. Los nódulos se sumergieron por 5-10 segundos en etanol al 95%, (para romper la tensión superficial y remover burbujas de aire de los tejidos); se transfirieron a una solución 2.5-3% (v/v) de hipoclorito de sodio por 2 a 4 minutos y después fueron lavados con abundante agua bidestilada estéril en cinco veces con fórceps estériles para transferirlos y recipientes estériles para el alcohol y para el agua. Después los nódulos fueron aplastados con la ayuda de pinzas sobre agua estéril en un plato petri y se sembró una muestra con asa bacteriológica en cada uno de los siguientes platos:

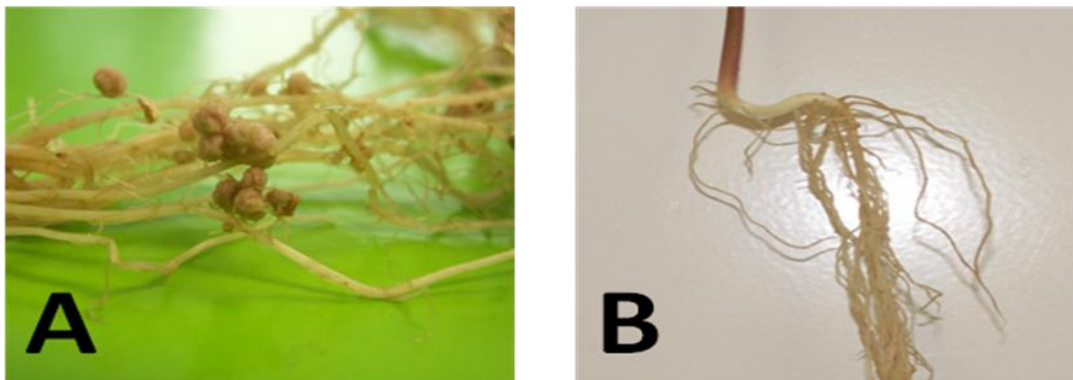
Plato de agar Manitol-extracto de levadura (YMA), Manitol 10g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g/L, MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 0.2g/L, NaCl 0.1 g/L, extracto de levadura 0.5 g/L, Agar 15 g/L, conteniendo 25 ppm de rojo Congo (CR), generalmente *Rhizobium* no absorben el color rojo cuando las placas



son incubadas en oscuridad, las colonias permanecen blancas, opacas, otros organismos que contaminen la placa pueden absorber el color rojo (Somasegaran & Hobben, 1985), incluso los cercanamente relacionados como *Agrobacterium spp* (Kneen & Larue, 1983).

Plato de agar Manitol-extracto de levadura (YMA), Manitol 10g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g/L, MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 0.2g/L, NaCl 0.1 g/L, extracto de levadura 0.5 g/L, Agar 15 g/L, conteniendo 25 ppm de azul de Bromotimol. El crecimiento lento *Rhizobium* presenta reacción alcalina en el medio tornándolo de color azul. El crecimiento rápido de *Rhizobium* torna el medio de color amarillo (Somasegaran & Hobben, 1985).

Plato de agar Peptona-extracto de levadura (PYA) (Bravo & Mora, 1988), Peptona 0.5%, extracto de levadura 0.3%, Cloruro de calcio 0.07M, Agar 15g/L, conteniendo ácido nalidíxico 20 µg/mL.



**Figura 3.1** Estructuras globosas presentes en raíces infectadas por *Rhizobium* (A). Raíces no infectadas (B). Fuente el autor.

Plato de agar Peptona-glucosa (PGA) Glucosa 5g/L, Peptona 10g/L, Agar 15g/L, conteniendo 100 ppm de bromocresol purpura. *Rhizobium* crece pobremente en PGA y causa un ligero cambio de pH, sin embargo, si se observa mucho crecimiento es señal de contaminación (Somasegaran & Hobben, 1985).

### **3.3. Obtención de proteína ligadora de folatos**

La proteína ligadora de folatos fue obtenida mediante cromatografía de afinidad con columnas de afinidad acopladas con ácido fólico (Varela-Moreiras, Seyoum, & Selhub, 1991), las cuales se elaboraron lavando 100 mL de sefarosa 4B con 400 mL de agua bidestilada. Para esto se suspendió la resina en 100 mL de agua y se añadió 7.5 g de CNBr en campana química de forma lenta manteniendo el pH 10 – 11 y a temperatura ambiente, se filtró y se lavó con 400 mL de NaHCO<sub>3</sub> frío sin permitir que se secase, el pastel de sefarosa se mezcló con una solución de 2.25g de diaminohexano en 500 mL de 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> a pH 9.0, se removió de la campana a 4°C con agitación por barra magnética por 48 horas, después se filtro en embudo de vidrio y se lavó con 400 mL de 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> y luego se re suspendió a temperatura ambiente en 100 ml de NaHCO<sub>3</sub>. La sefarosa activada se mezcló posteriormente con 1 g de ácido fólico (AF) suspendido en 10 mL de agua, agitando generosamente a pH de 8.5, se añade 1 g de EDAC por periodo de 45 minutos a temperatura ambiente, se agitó por 3 horas a temperatura ambiente y 48 horas a 4°C, la suspensión se lavó con 1 Lt de 0.05M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> conteniendo 2M NaCl, pH 7, luego se lavó con 400 mL de agua, luego se lavó con 200 mL de 0.2M ácido acético, luego se lavó con 400 mL de agua, se re suspendió en 100 mL de agua, se cargó la sefarosa + AF en columnas cromatográficas y se lavó con 200 ml de 1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y luego con 200 mL de agua.

Una vez listas las columnas AF se procedió a cargar en ellas suero de leche (Concentrado de proteína láctea AP MEGA Protein, OGS´S, 27,3 grs de proteína por cada 35 grs de producto, sin malto dextrina, ni fructosa ni leche descremada) en exceso, el cual debe ser previamente centrifugado y filtrado para eliminar la grasa la cual puede tapan las columnas, el flujo debe ser por gravedad. Terminando de pasar la solución de suero de leche se lavaron las columnas con 1 L de 0.05 M Tris-HCl conteniendo 1 M NaCl a pH 7.4, luego se lavó con 1 L de agua, las proteínas ligadoras de folatos (FBP) se eluyeron con 0.2 M ácido acético (~500 ml). Se colectaron fracciones y monitoreo su absorbancia A280 y juntaron las que contenían mayor absorbancia, para someterlas a diálisis, para eliminar aquellas proteínas de un tamaño menor a 12000 mwco. La membrana de diálisis (Spectral/Por, mwco 12-1400) fue hidratada previamente por 1 hora y lavada para remover contaminantes, las fracciones de FBP fueron cargadas en el tubo de diálisis y puestas en un recipiente con 5 galones de agua bidestilada fría con agitación durante 12 horas, después se cambió el agua y se dejó a 4°C con agitación por otras 12 horas. Luego la FBP dializada se liofilizó y el producto obtenido es lo suficientemente enriquecido para ser usado en columnas de cromatografía de afinidad.

#### **3.4. Cromatografía de afinidad para folatos**

Las columnas de cromatografía de afinidad para folatos (Selhub, Ahmad, & Rosenberg, 1980) se hicieron ligando la FBP, obtenida como se describió anteriormente, a Affigel 10 (Biorad 153-6052), para esto se transfirió a embudo de vidrio 25 ml de Affigel 10, se lavó con 4 volúmenes de agua bidestilada fría, luego se mezcló con 20 mL de 0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a pH 7 conteniendo 100

mg de FBP, a 4°C. y se agitó por 12 horas, se filtró en embudo de vidrio, se lavó tres veces con 20 mL de 0.05 M KAc frío a pH 6.5, luego se lavó tres veces con 20 mL de 0.05 M KAc frío conteniendo 1M NaCl a pH 6.5, monitoreando que en el último lavado ya no salieran más FBP, por medio del método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando albúmina de suero bovino como estándar. El gel se re-equilibró con varios lavados de 0.05 M KAc frío a pH 6.5. Luego se almaceno a 4°C hasta su uso.

La capacidad de las columnas FBP se determino aplicando una solución de 50 nM de ácido fólico y monitoreando la retención de éste por absorbancia A282, sin aplicar ascorbato, ni ácido ascórbico al ácido fólico cargado en las columnas.

### **3.5. Expresión y purificación de la $\gamma$ -glutamyl hidrolasa**

Se transformó por electroporación células de la bacteria *Escherichia coli* BL21(DE3) *pLys* con el vector pET28b- AtGGH1, y otras con el inserto AtGGH2, proporcionadaS amablemente por el doctor Andrew D. Hanson (University of Florida), Las bacterias se sembraron en placas de agar con 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de kanamicina y 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de cloranfenicol como antibióticos de selección y se incubaron a 37°C toda la noche, al siguiente día una colonia fue utilizada para inocular en 20 mL de medio LB adicionado con 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de kanamicina y 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de cloranfenicol como antibióticos de selección. Se incubó durante toda la noche a 37°C con una agitación de 250 rpm. Este cultivo se utilizó como inóculo para 1 litro de medio LB más antibióticos ajustando a una densidad óptica A600 de 0.05 – 0.1. Posteriormente se incubó a 30°C con agitación  $\geq$  225 rpm, hasta llegar a una densidad óptica de A600= 0.5-0.6 cuando se comenzó la inducción añadiendo

IPTG a una concentración final de 1mM y se prolongó la incubación en las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica de A600 1.6-1.8. Las bacterias se colectaron por centrifugación a 5000 x g por 5 min y después el pellet se almacenó a -20°C.

Para la extracción de proteína el pellet bacteriano se descongeló en hielo y se homogenizó en 10 mL de buffer de lisis (50 mM fosfato de potasio, pH 8.0, 1.5 M NaCl, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol) y se dividió cuidadosamente en microtubos con tapa rosca de 2 mL conteniendo ~0.7ml de perlas de zirconia (0.1 mm  $\emptyset$ ). Durante todo el procedimiento se trabajó a 4°C y se evitó dejar burbujas al llenar los microtubos para impedir la proteólisis. Se rompió las células mediante agitación con vortex (3 x 30 seg). Luego se centrifugó a 16000 x g por 10 min. A 4°C. El extracto clarificado se recupera y se desecha el pellet.

La purificación de las proteínas (que contienen colas de histidina en la terminal carboxilo) se realizó por medio de cromatografía de afinidad utilizando resina ligada a Níquel (Quiagen cat. 30210). En cada purificación se usaron 3 ml de resina de Níquel, los cuales se lavan con 20 mL de buffer lisis en tres ocasiones. El procedimiento de purificación es el siguiente:

- Mezclar el extracto clarificado con la resina pre-equilibrada
- Incubación por 1 h a 4°C con agitación de 60 rpm.
- Empacado de resina con muestra en columna (se utiliza una bomba peristáltica para controlar el flujo a 0.5 mL/min
- Colección del primer eluato que corresponde al conjunto de todas las proteínas de la *E. coli*, que no fueron retenidas por la columna,

- Lavado de la columna con 50 mM fosfato de potasio, pH 8.0, 0.5 M NaCl, 20mM de imidazol, y 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol. Este lavado se realiza hasta alcanzar una densidad óptica  $A_{280} \leq 0.05$ .
- La proteína ligada se eluye con 50 mM fosfato de potasio, pH 8.0, 0.5 M NaCl, 250mM de imidazol, y 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol.

Se colectaron fracciones de 1mL y se midieron  $A_{280}$  se concentraron las más altas hasta 2.5 mL, los cuales se cargaron en columnas PD-10 (Amersham Biosciences cat. 17-0851-01) con el propósito de desalinizar la preparación. Estas columnas fueron pre-equilibradas, y eluidas con 100 mM fosfato de potasio, pH 6.0, 10% de glicerol y 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, siguiendo las instrucciones del proveedor. Las proteínas fueron estimadas por medio del método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando albúmina de suero bovino como estándar, se confirmó mediante electroforesis de proteínas SDS-PAGE la presencia mayoritaria de cada proteína, de acuerdo con sus masas moleculares, para AtGGH169.8 kDa y para AtGGH2 66.0 kDa (Orsomando et al., 2005). Las enzimas se almacenaron en alícuotas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.6. Optimización del proceso de extracción**

#### 3.6.1. Evaluación de la inactivación enzimática al inicio de la extracción

En el proceso de optimización del método de extracción se evaluó un paso que ha hecho parte del proceso de extracción de folatos por décadas, pero el cual ha sido cuestionado por algunos

autores (Hyun & Tamura, 2005) quienes sugieren que es un paso innecesario el cual genera pérdidas y que puede ser omitido cuando la muestra es sometida a tratamiento con proteasa. Dicho paso es el tratamiento con calor al inicio de la extracción, usado en la desnaturalización de proteínas para liberar los folatos ligados a ellas. Para evaluar la utilidad de este paso en el proceso de extracción se ensayo en cotiledones de frijol la aplicación y la no aplicación de tratamiento con calor 100°C por 10 min, antes de la aplicación de la proteasa, siguiendo el procedimiento indicado en la sección 3.7 extracción de folatos. Este experimento se realizó por triplicado y con adición de estándares para la evaluación de la recuperación durante el proceso de extracción para las clases de folatos 5-CH<sub>3</sub>- THF, 5,10-CH= THF, 5-CHO- THF y ácido fólico. El método de identificación y cuantificación utilizado es como se describe en la sección 3.8 análisis por HPLC.

### 3.6.2. Diseño de programa de HPLC

Para asegurar una buena separación de las distintas clases de folatos mono- glutamilados, inicialmente se corrieron soluciones de estándares de folatos monoglutamilados, utilizando diferentes condiciones de fase móvil y gradiente, hasta lograr una separación de las señales de los estándares entre ellos y de las señales producidas por otros compuestos presentes en la muestra tales como el ácido ascórbico utilizado para proteger las muestras

El programa de gradiente del HPLC desarrollado para folatos monoglutamilados (Tabla 3.3), logra una disminución de 10 min por corrida, frente al reportado por (R. Diaz de la Garza et al., 2004), lo cual reduce el tiempo de espera de las muestras en el automuestreador y por lo tanto el

tiempo de exposición de estas a la degradación. Sin embargo es evidente la degradación parcial de los folatos durante el proceso de extracción, purificación y análisis, por la reducción de la recuperación de estándar interno, ácido fólico, a medida que se inyectan las muestras, a pesar de purgar con Nitrógeno cada vial, de contar con automuestreador refrigerado y en total oscuridad, la disminución se presenta en promedio en 4.54% del ácido fólico recuperado, valor calculado de acuerdo a la disminución presentada entre la primera y la última inyección de las muestras de cada tratamiento.

**Tabla 3.3** Programa de elución no lineal de las fases móviles en HPLC desarrollado para folatos mono-glutamilados. Fase móvil A contiene (28 mM  $K_2HPO_4$  y 0.59 mM  $H_3PO_4$  pH 2.5) y la fase móvil B (75% de fase A (vol/vol) y 25% de  $CH_3CN$ ).

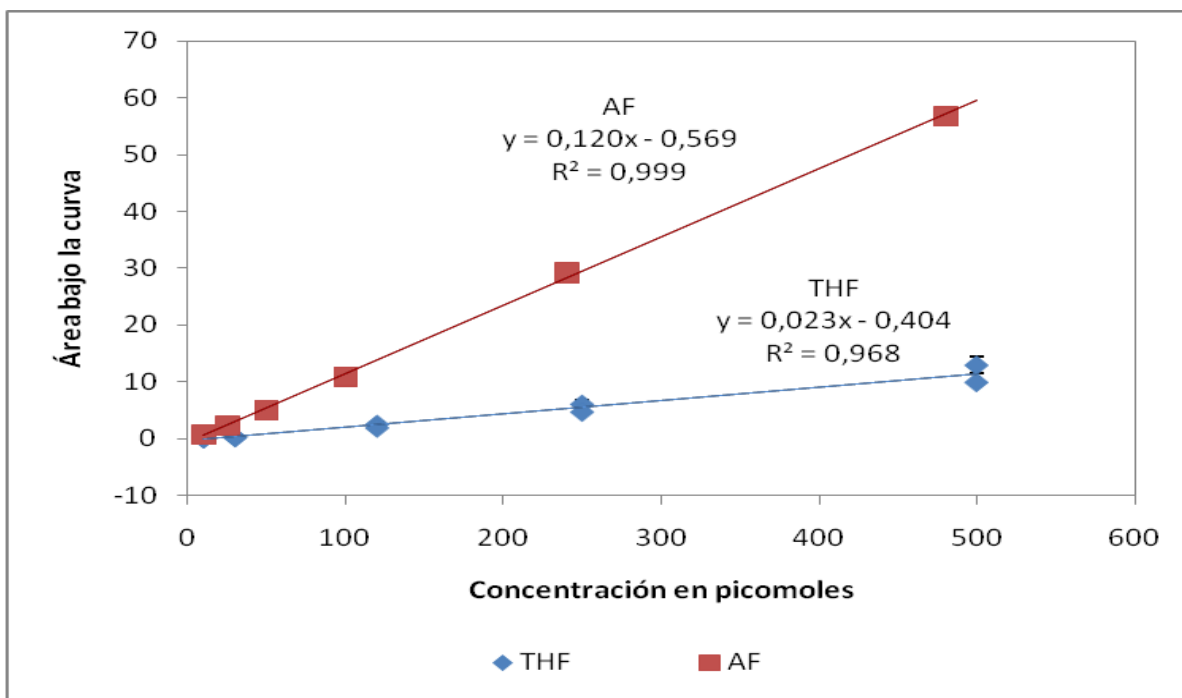
Tiempo (min)	% A	% B
0	90	10
10	90	10
15	70	30
27	20	80
35	0	100
40	90	10

La curva de calibración se elaboró por medio de la inyección de diferentes concentraciones de estándares de cada clase de folato (Tabla 3.4), la señal monitoreada mediante la respuesta del detector electroquímico al programa de gradiente del HPLC desarrollado para folatos monoglutamilados, presentó respuesta lineal y una fuerte asociación para cada uno de los 5 estándares de folatos utilizados (Figura 3.2 y 3.3).



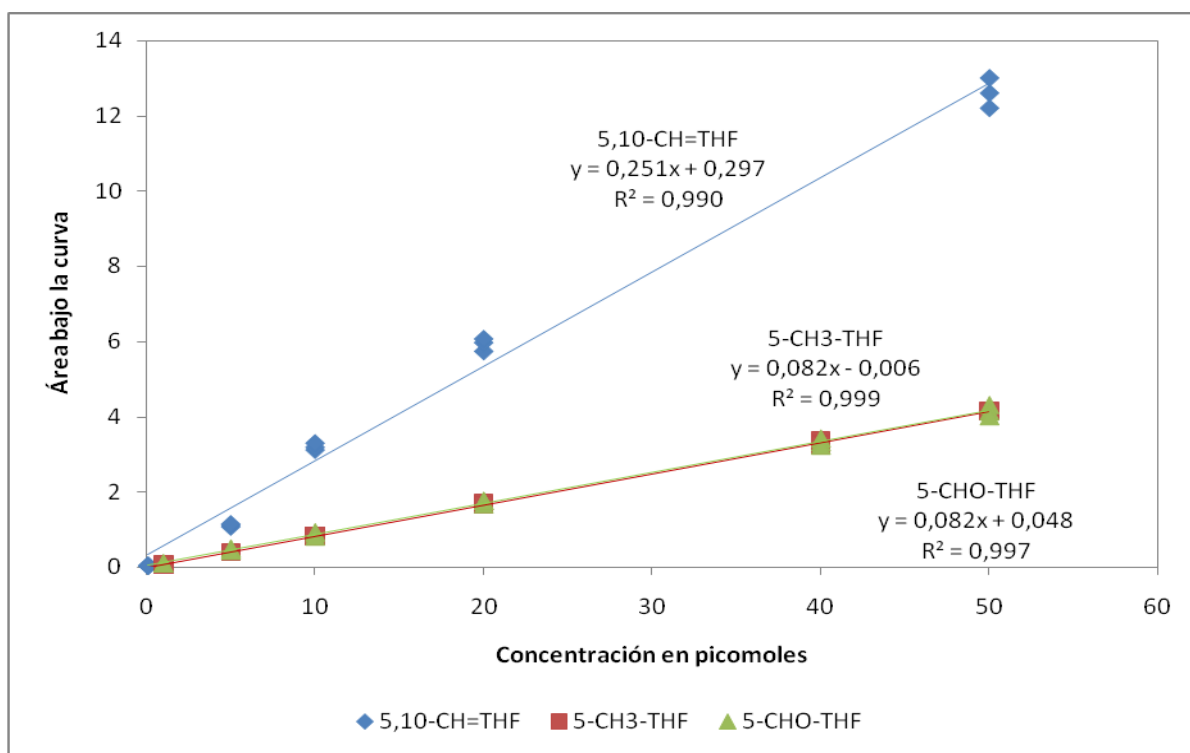
**Tabla 3.4** Concentraciones en picomoles de cada especie de folato utilizadas para construir curva de calibración.

clase de folato	Concentración mínima (pmol)	Concentraciones máxima (pmol)
THF	10	500
5-CH <sub>3</sub> - THF	1	50
5,10-CH= THF	0.1	50
5-CHO- THF	1	50
AF	10	480

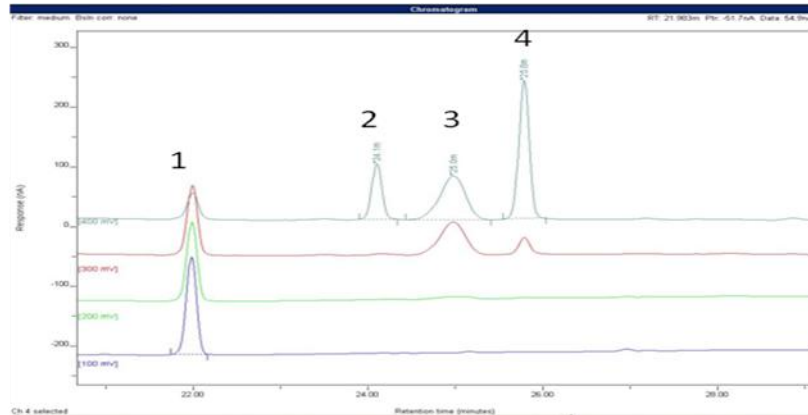


**Figura 3.2** Linealidad de respuesta cromatográfica de diferentes concentraciones en picomoles de estándares de tetrahidrofolato (THF) y ácido fólico (AF), cuantificados con detector electroquímico, con el programa de gradiente del HPLC desarrollado para folatos monoglutamilados.

En la Figura 3.4 se puede observar un cromatograma representativo de los distintos folatos separados, por el programa de HPLC desarrollado, se puede apreciar que cada folato tiene una respuesta característica en cada uno de los cuatro canales del detector, la combinación de tiempo de retención y patrón de respuesta producidos por cada estándar, fueron utilizados para identificar cada especie en las muestras. El canal que responde con mayor sensibilidad a cada compuesto específico fue el utilizado para cuantificar cada especie de folato.



**Figura 3.3** Linealidad de respuesta cromatográfica de diferentes concentraciones en picomoles de estándares de cinco metil tetrahydrofolato (5-CH<sub>3</sub>-THF), cinco, diez tetrahydrofolato (5,10-CH= THF), cinco formil tetrahydrofolato (5-CHO-THF), cuantificados con detector electroquímico, con el programa de gradiente del HPLC desarrollado para folatos monoglutamilados.



**Figura 3.4** Separación de estándares de folatos por HPLC, después de elución de fase móvil con gradiente, características descritas en Tabla 55, los folatos identificados con detector electroquímico en el cromatograma son: 1.) 5-CH<sub>3</sub>- THF (21.98 min.), 2.) 5,10-CH= THF (24.1 min.), 3.) 5-CHO- THF (25.0 min.), 4.) A.F. (25.8 min.) a diferentes concentraciones.

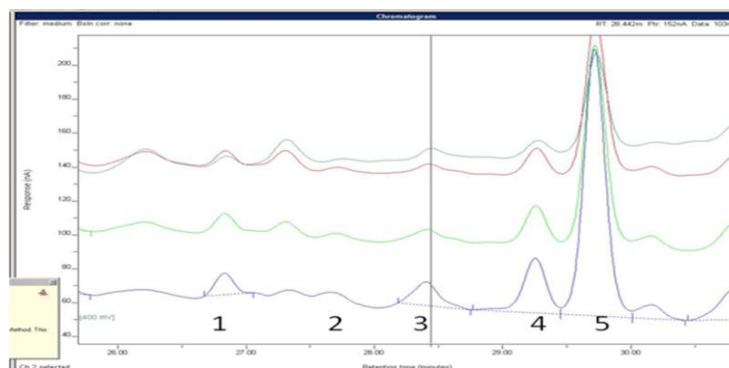
También se desarrollo un programa de gradiente del HPLC para los folatos poliglutamidados, las condiciones de fase móvil y gradiente se describen en la Tabla 3.5.

**Tabla 3.5** Programa de elución no lineal de las fases móviles en HPLC desarrollado para folatos poli- glutamilados. Fase móvil A contiene (28 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0.59 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 2.5) y la fase móvil B (75% de fase A (vol/vol) y 25% de CH<sub>3</sub>CN).

Tiempo (min.)	% A	% B
0	90	10
10	90	10
20	70	30
50	20	80
55	0	100

60	90	10
----	----	----

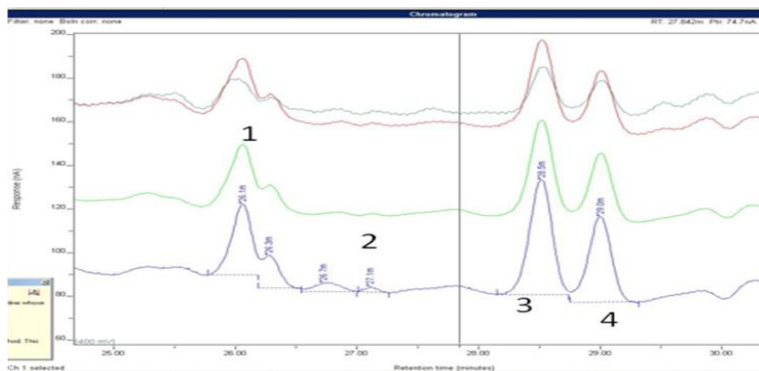
En la Figura 3.5 se puede observar un cromatograma representativo de muestras de fruto de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill., cv. MicroTom) utilizados como referencia, separados por el programa de HPLC desarrollado. En la Figura 3.6 se puede observar un cromatograma representativo de los distintos folatos poli-glu separados en muestras de hoja de frijol.



**Figura 3.5** Cromatograma de muestras de fruto de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill., cv. MicroTom), en la que se observa la respuesta electroquímica de los canales 1, 2, 3 y 4 a 100, 200, 300 y 400 mV, respectivamente. Los folatos observados son: 1.) 5-CH<sub>3</sub>-THF mono-glu (26.7 min.), 2.) 5-CH<sub>3</sub>-THF di-glu (27.6 min.), 3.) 5-CH<sub>3</sub>- THF tetra-glu (28,5 min.), 4.) 5-CH<sub>3</sub>-THF penta-glu (29.3 min.), 5.) 5-CH<sub>3</sub>- THF hexa-glu (29.7 min.).

Para folatos poli-glutamilados también se desarrolló un programa de HPLC que garantizara la separación de las diferentes formas poli-glutamiladas del 5-CH<sub>3</sub>-THF. El procedimiento de identificación y cuantificación para folatos poli-glutamilados, se realizó como se describió para folatos mono-glutamatos, utilizando para cuantificación el estándar mono-glutamilado y para

identificación los folatos poli-glutamilados presentes en Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill., cv. MicroTom) donde se encuentran folatos poli-glutamilados del 5-CH<sub>3</sub>-THF siendo mayoritario el hexa-glutamilado (R. Diaz de la Garza, et al., 2004).



**Figura 3.6** Cromatograma de muestras de hoja de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.), los folatos identificados con detector electroquímico en el cromatograma son: 1.) 5-CH<sub>3</sub>-THF mono.glu (26.1 min.), 2.) 5-CH<sub>3</sub>-THF di-glu (27.1 min.), 3.) 5-CH<sub>3</sub>- THF penta-glu (28,5 min.) 4.) 5-CH<sub>3</sub>- THF hexa-glu (29 min.).

### 3.7. Extracción de folatos

Los folatos fueron extraídos de las muestras de tejidos almacenadas a -80°C mediante homogenización en nitrógeno líquido en mortero y agregados en 10 mL de 50 mM Na-Hepes/50mM Ches pH 7.85 conteniendo 1mM de CaCl<sub>2</sub>, 2% (p/v) de Na-ascorbato, y 10 mM de β-mercaptoethanol, seguido de 10 minutos a 100°C (denominado como hervir) y 10 minutos de enfriado en hielo.

Para la extracción de semillas o cotiledones se aplicó 47U/g de proteasa de *Streptomyces griseus* tipo XIV (P5147-SIGMA) incubándose a 37°C por 2 horas, seguido de 10 minutos de hervir para inactivar las proteasas y 10 minutos de enfriado en hielo, bajando posteriormente el pH a 6 y añadiendo 3000U/g de  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus sp.* Tipo II-A, y 0,1 mg/g de GGH1S y GGH2S y se incubaban a 37°C por 2 horas. A las muestras luego se les ajustó el pH a 7.4 y fueron hervidas por 10 minutos y 10 minutos de enfriado en hielo. Si las muestras eran de otros tejidos diferentes a cotiledones no se utilizaba la proteasa ni la  $\alpha$ -amilasa.

Luego del tratamiento enzimático los extractos se centrifugó (11000 x g) por 20 minutos. El sobrenadante se filtró con vacío en papel filtro Watman #1 y se aplicó a las columnas de cromatografía de afinidad FBP, el flujo de las columnas fue controlado mediante bomba peristáltica multicanales (8-canales) conectada a la salida de las columnas a un flujo de 0.5 mL/min.

Una vez que el extracto pasó por la columna y sin permitir que está se secase se lavó con 10 mL de 25 mM de fosfato de potasio (pH 7.4), 1 M NaCl y 1% Na-ascorbato. En el caso de las muestras de cotiledones, las columnas se lavaron con 80 mL del mismo buffer + 10mM de  $\beta$ -mercaptoethanol, luego se lavó con 10 mL de 25 mM de fosfato de potasio (pH 7.4), y 1% Na-ascorbato, las muestras de cotiledones se lavaron con 70 mL del mismo buffer + 10mM de  $\beta$ -mercaptoethanol y luego con 10 mL del buffer sin  $\beta$ -mercaptoethanol. Para todos los tejidos extraídos los folatos fueron eluidos con 5 mL de 28 mM  $K_2HPO_4$  y 0.59 mM  $H_3PO_4$  pH 2.5 (fase móvil A del HPLC) conteniendo 1% de ácido ascórbico. Lo eluido fue filtrado por membranas

de 0.45  $\mu\text{m}$ , la mitad se almaceno a  $-80^{\circ}\text{C}$  y el resto se colocó en vial ambar, se purgo con  $\text{N}_2$  gas y se llevo al HPLC.

### **3.8. Análisis por HPLC**

Muestras del eluato de las columnas de afinidad fueron utilizadas para el análisis por HPLC con detección electroquímica usando una columna Atlantis dC18 de 5- $\mu\text{m}$ , y 150 x 4.6mm y un detector de 4 canales (CoulArray modelo 5600A, ESA, Chelmsford, MA) con potenciales 100, 200, 300 y 400 mV. La fase móvil A fue 28 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y 0.59 mM  $\text{H}_3\text{PO}_4$  pH 2.5 y la fase móvil B fue una combinación del 75% de fase A (vol/vol) y 25% de  $\text{CH}_3\text{CN}$ , con un programa de elución no lineal de 45 min. Desde 90% de fase A hasta 100% de fase B a un flujo de 1 mL/min. La respuesta del detector fue calibrada mediante el uso de estándares de THF, 5-metil-THF, 5,10-metencil-THF, 5-formil-THF de Schircks y ácido fólico de SIGMA. Para el análisis de los diferentes folatos poliglutamatos, el tratamiento con GGH fue omitido. Folatos extraídos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill., cv. MicroTom) fueron utilizados para identificar los tiempos de retención de los 5-metil-THF poliglutamatos. La técnica de extracción fue la misma utilizada para frijol excepto el uso de la GGH.

Dadas las bajas concentraciones en las que se presentan los folatos en las muestras cada inyección en el HPLC era de 800  $\mu\text{L}$  de los 5 mL recuperados de las columnas de afinidad, dado que la señal obtenida en los cromatogramas presenta pequeños picos o señales a lo largo de todo el cromatograma cada 6 muestras se inyectaron mezclas de estándares para verificar los tiempos de retención. Ligeras diferencias de concentración en las fases móviles pueden cambiar los

tiempos de retención, por lo cual estas deben prepararse exactamente igual en cada ocasión y filtrarse a diario.

### **3.9. Diseño experimental y Análisis Estadístico**

Se planteó un experimento factorial, de tres factores y dos niveles, donde los factores de estudio fueron inoculación con *R. etli*, fertilización con nitrógeno y tiempo, para cada factor se trabajaron 2 niveles, con y sin para los dos primeros e inicial y final para el factor tiempo (Tabla 3.6). Las combinaciones experimentadas fueron:

con *R. etli* + sin nitrógeno + tiempo inicial

sin *R. etli* + sin nitrógeno + tiempo inicial

con *R. etli* + sin nitrógeno + tiempo final

sin *R. etli* + sin nitrógeno + tiempo final

sin *R. etli* + con nitrógeno + tiempo final

Las plantas se empezaron a ferti-irrigar a partir del día 16 y al tiempo final no se tiene la combinación con *R. etli* y con nitrógeno porque debido al alto costo energético de la asimilación de nitrógeno atmosférico mediante simbiosis las plantas ejercen regulación de dicha simbiosis cuando tienen disponibilidad de fuentes de nitrógeno, como lo pudimos observar al crecer plántulas inoculadas con *R. etli* en tierra y no obtener nódulos. Se aplicó un análisis de Varianza (ANOVA) a los datos utilizando el programa MINITAB 14



**Tabla 3.6** Matriz para diseño factorial, de tres factores y dos niveles

<b>Factor</b>	<b>Niveles</b>	
<i>R. etli</i>	Sin	Con
Nitrógeno	Sin	Con
Tiempo	Inicial	Final

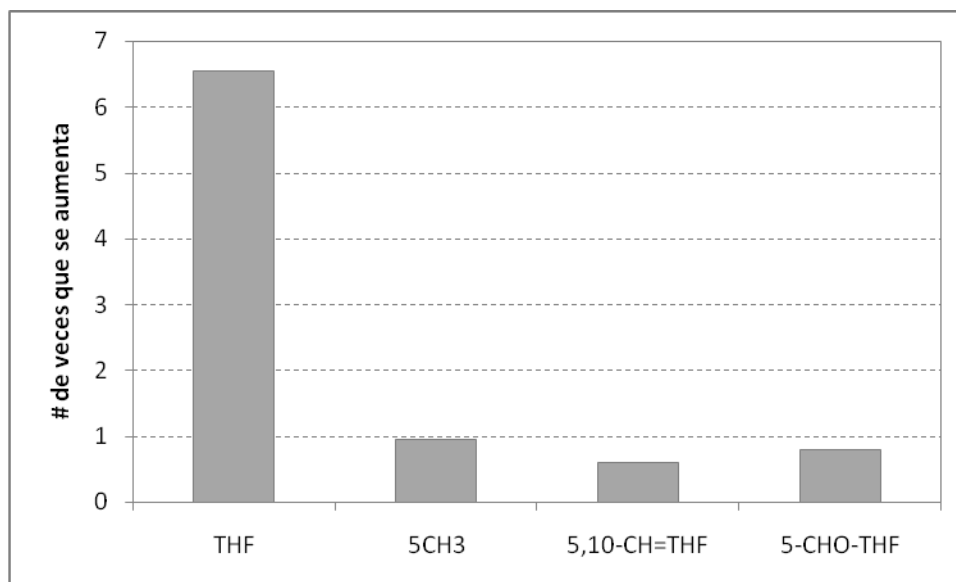
Durante las pruebas de establecimiento de condiciones de extracción de folatos en cotiledón y semilla de frijol se calcularon los intervalos de confianza mediante la prueba T.

## **Capítulo IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1 Establecimiento de condiciones de extracción de folatos en cotiledón y semilla de frijol.**

Como se mencionó en materiales y métodos, existe una controversia sobre el uso de tratamiento térmico cuando se utiliza proteasa en el método de extracción trienzimático (Hyun & Tamura, 2005), por esta razón evaluamos la recuperación de ácido fólico utilizando las dos opciones (con o sin tratamiento térmico). Cuando omitimos el hervido de la muestra por 10 minutos, inmediatamente después de ser homogenizada, se observa contenidos muy altos de THF (Figura 4.1). Posiblemente por la interconversión del ácido fólico y otras clases de folatos por enzimas que no fueron desactivadas y que actúan aún cuando el extracto tenía la proteasa. (Probablemente la dihidrofolato reductasa empieza a actuar sobre el folato sintético, reduciéndolo a THF), la no inactivación de las enzimas de la muestra y su posterior acción en la interconversión de los folatos, impiden la cuantificación de las clases naturales de folatos presentes en la muestra.

La recuperación de ácido fólico para el tratamiento sin hervir antes de la Proteasa fue del 52% e hirviendo fue del 55%. Por lo que los resultados se presentan sin una corrección de recuperación del ácido fólico, dado a que este se puede estar interconvirtiendo. Dado que las diferencias entre un método y otros son estadísticamente significativas (Tabla 4.1), las extracciones trienzimáticas aplicadas a los cotiledones, se realizaron hirviendo la muestra homogenizada antes del tratamiento con proteasa, tanto para liberar los folatos ligados a proteínas como para inactivar enzimas responsables de la interconversión de las diferentes clases de folatos.



**Figura 4.1** Número de veces que se aumenta cada clase de folato cuando la muestra no es hervida antes del tratamiento tri-enzimático. Recuperación de AF del 55% (+hervir) y 52% (-hervir). Valores menores a 1 indican disminución.

**Tabla 4.1** valores *P* obtenidos por prueba T con un nivel de significancia del 5% para contenido de folatos en semilla de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.), en optimización del proceso de extracción utilizando el programa MINITAB 14

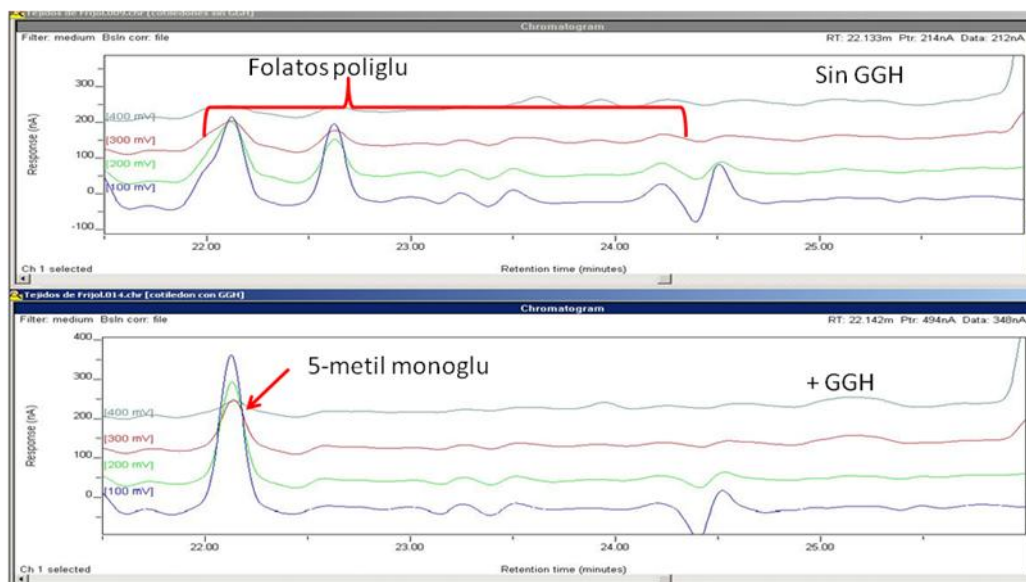
Factores	THF	5-CH <sub>3</sub> -THF	5,10-CH=THF	5-CHO-THF	Totales
hervir	0.002	0.478	0.038	0.126	0.008

#### 4.1.1 Evaluación de deconjugación con $\gamma$ -glutamyl hidrolasa

En la deconjugación se probó la actividad de las  $\gamma$ -glutamyl hidrolasas de origen vegetal AtGGH1 y AtGGH2 utilizando el método de extracción descrito en la sección 3.7 extracción de folatos, en muestras de cotiledón y hoja, probando la adición de cada enzima por separado y en

combinación, así como en diferentes concentraciones, y con diferentes tiempos de incubación. El método de identificación y cuantificación utilizado es como se describe en la sección 3.8 análisis por HPLC.

Es la primera vez que se reporta la utilización de la enzima vegetal  $\gamma$ -glutamil hidolasa, con fines analíticos y los mejores resultados se hallaron en la utilización combinada de GGH1s + GGH2s en 0.1mg por cada gramo de muestra, incubando durante 2 horas a 37°C, pH 6 (Figura 4.2).



**Figura 4.2** Efecto del tratamiento de deconjugación desarrollado con  $\gamma$ -glutamil hidolasa de origen vegetal (GGH) sobre las diferentes formas poliglutamiladas de 5-CH<sub>3</sub>-THF en cotiledón de frijol.

En la Figura 4.2 se observa un cromatograma representativo del efecto del tratamiento de deconjugación desarrollado en muestra de cotiledón, se puede observar en la parte superior los diferentes 5-CH<sub>3</sub>-THF poliglutamilados presentes en las muestra de cotiledón en la cual no se

utilizó la  $\gamma$ -glutamil hidolasa, en la parte inferior se observa el cromatograma del mismo tejido tratado con 0.1mg/g de GGH1s + GGH2s por 2 horas a 37°C, pH 6.0 se aprecia como las diferentes formas poliglutamiladas de 5-CH<sub>3</sub>-THF son convertidas a 5-CH<sub>3</sub>-THF monoglutamilado por la acción de las enzimas.

## 4.2 Análisis de Folatos de Frijol negro Jamapa 81

Para tener un conocimiento de las diferencias en contenidos, clase y nivel de glutamilación en distintos tejidos del frijol durante su desarrollo las plántulas se dividieron en diferentes tejidos que fueron analizados por separado en triplicado (Figura 4.3). Las cuantificaciones fueron ajustadas con respecto a la recuperación del ácido fólico, la cual en promedio fue de 82% para hoja, 73% para raíz, 70% para hipocótilo, 85% para embrión, 77% para epicótilo y 60% para cotiledón.



**Figura 4.3** División por tejidos de plántula de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.) a los 10 días de desarrollo para su análisis.

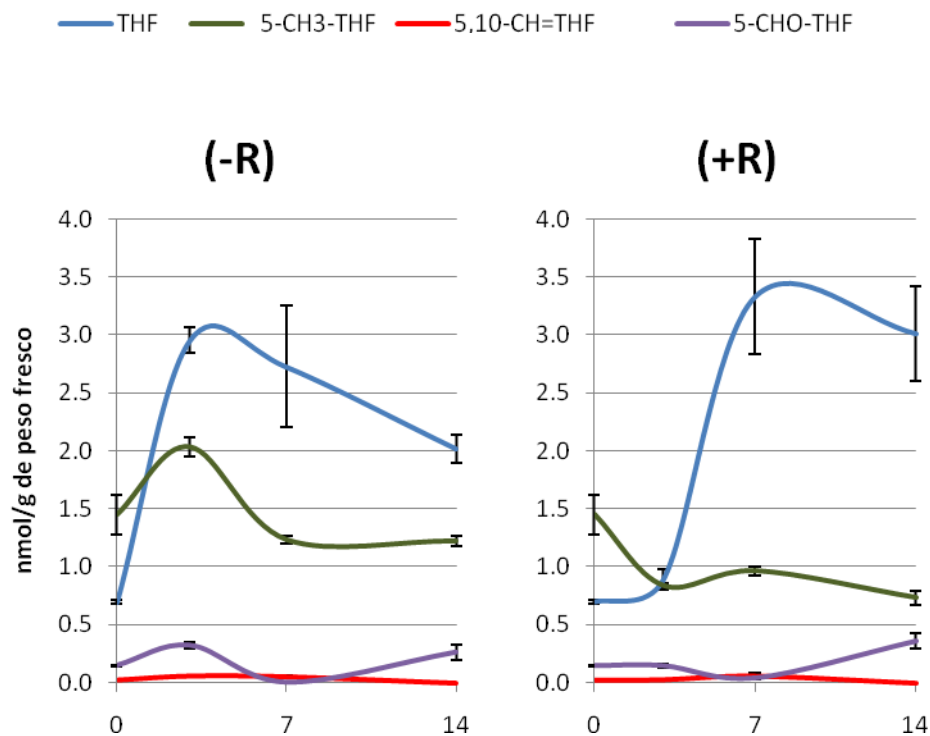
### 4.3 Folatos en Cotiledon

Los contenidos de folatos en semilla seca de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.), fueron en promedio 2.32 nmol/g ó 106 µg/100g, esto concuerda con los valores hallados por análisis de dilución de isotopos estables (SIDA) (Rychlik, Englert, Kapfer, & Kirchhoff, 2007), siendo de 3 a 4 veces menores que los reportados por métodos microbiológicos (Augustin & Klein, 1989; USDA, 2005). Cuando comparamos la abundancia de las clases de folatos presentes en cotiledones de frijol (Figura 4.4), con lo reportado por otros autores en otras especies de leguminosas observamos diferencias, por ejemplo en chícharo (*P. sativum*) donde la especie más abundante es el 5-CH<sub>3</sub>-THF (Chan & Cossins, 2003; Orsomando, et al., 2005); en semillas secas de black-eyed peas (*Vigna unguiculata*) y en cacahuete (*Arachis hypogaea*) la especie más abundante es el 5-CHO-THF (Rychlik, et al., 2007), en cambio nuestros resultados coinciden con lo reportado para habichuela (*P. vulgaris*) tanto en la abundancia del THF como principal especie al igual que en su concentración, 0.69nmol/g ó 31ug/100grs. nuestros resultados, al igual que otros reportados (Rychlik, et al., 2007) parecen demostrar que la dominancia general de 5-CH<sub>3</sub>-THF parece no ser válida para todas las leguminosas.

Estas discrepancias pueden deberse a diferentes factores, tales como diferencias propias entre las especies, y/o a la labilidad de las diferentes clases de folatos, y/o a el límite de detección utilizado, y/o a la interconversión de folatos durante la extracción ó incluso durante su separación por HPLC cuando se utiliza una fase móvil ácida, como es el caso de este trabajo, porque el 10-CHO-THF y el 5,10-CH<sub>2</sub>-THF no pueden ser cuantificados porque son convertidos

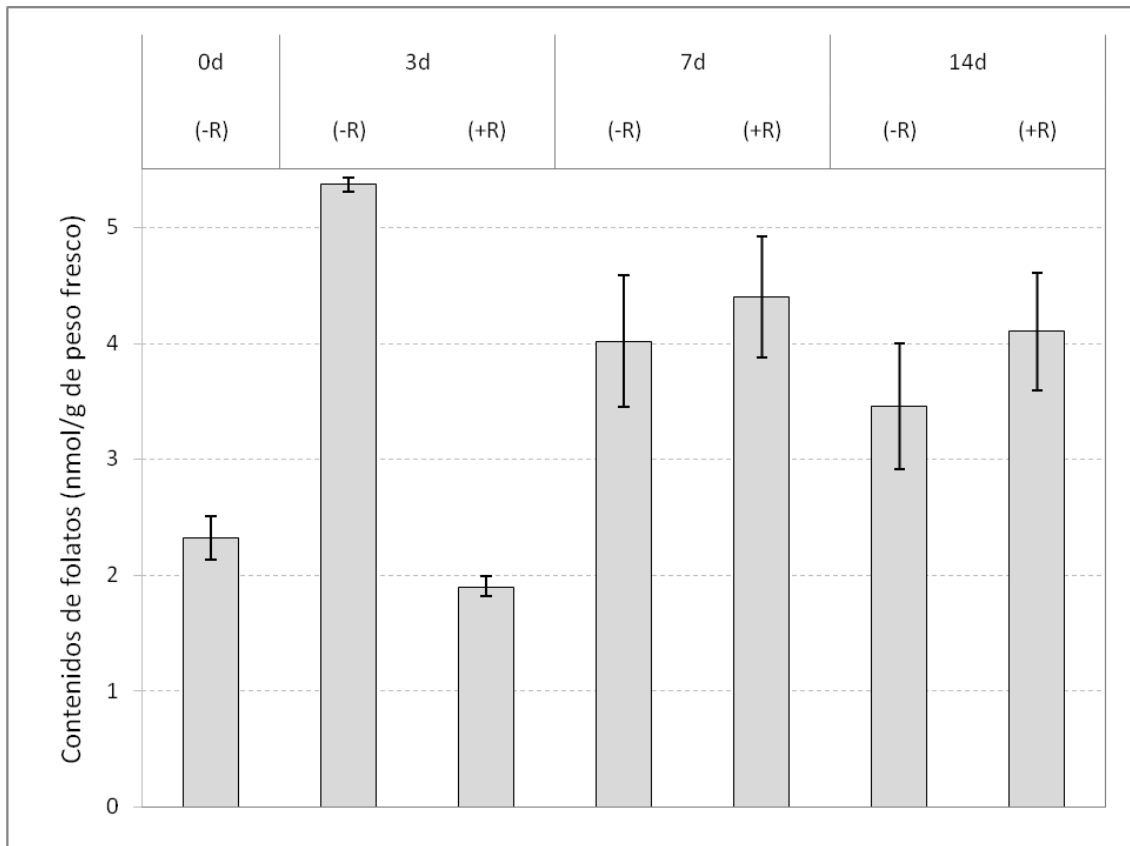
a 5,10-CH=THF y THF respectivamente (De Brouwer, Zhang, Storozhenko, Van Der Straeten, & Lambert, 2007).

Los contenidos de folatos en cotiledones durante el desarrollo post-germinación, mostraron incremento tanto para plantas inoculadas con *R. etli* como para aquellas no inoculadas, en aquellas inoculadas al observar solo el valor correspondiente a cotiledones el aumento pareciera menor (Figura 4.5), pero si se suma a los cotiledones del tercer día de imbibición el valor encontrado en los embriones al mismo día (Figura 4.14), se puede apreciar que los valores son muy similares para ambos tipos de tratamientos, presentando un incremento de 4 veces en los contenidos de folatos con respecto al día cero (0).



**Figura 4.4** Contenido de las diferentes clases de folatos en Cotiledon de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.). Mediciones realizadas los días 0, 3, 7 y 14 de desarrollo post-germinación, a

tratamientos con (+R) y sin (-R) *Rhizobium etli*, así como con (+N<sub>2</sub>) y sin (-N<sub>2</sub>) fuente de nitrógeno. Las barras indican el error estándar calculado para cada clase de folato.



**Figura 4.5** Contenido de folatos totales en cotiledón de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.). Las mediciones fueron realizadas durante los días 0, 3, 7 y 14 de desarrollo post-germinación, en diferentes tratamientos con (+R) y sin (-R) *R. etli*. Las barras indican el error estándar calculado.

Nuestros resultados concuerdan con lo observado en cotiledones de chícharo (*P. sativum*) (Roos & Cossins, 1971), donde se observó que los folatos son sintetizados en los cotiledones durante el desarrollo post-germinación, alcanzando su máximo a aproximadamente 120 horas después de la imbibición, el incremento llega a ser de hasta 5 veces, (Koehler, Hartmann, Wieser, & Rychlik,



2007; Sahr, Ravanel, & Rebeille, 2005). Incluso una forma natural de aumentar los niveles de vitaminas en semillas destinadas a la alimentación es la germinación (Koehler, et al., 2007), de esta forma contenidos de vitaminas como riboflavina, tiamina, biotina, ácido pantoténico y folatos se incrementan de 1.5 – 3.8 veces frente aquellas semillas sin germinar (Merx, Seibel, Rabe, & Menden, 1994; Plaza, de-Ancos, & Cano, 2004).

En el día 7 de desarrollo post germinación, los cotiledones presentan altos contenidos de folatos totales (Figura 4.5). La biosíntesis de folatos en cotiledones concuerda con la demanda creciente por parte de la planta de unidades C<sub>-1</sub> para las actividades metabólicas necesarias para su normal desarrollo. Para el día 14 de desarrollo, cerca al día en el cual la planta deja de depender de las reservas almacenadas en los cotiledones y estos se marchitan, estos aun presentan folatos (Figura 4.5), posiblemente los cotiledones almacenan los folatos que producen cuando los demás tejidos ya son autosuficientes de cubrir sus requerimientos de folatos.

El nivel de significancia obtenido para las diferentes clases de folatos por los diferentes tratamientos planteados a través de la prueba de ANOVA (Tabla 4.2), muestra valores que demuestran los efectos estadísticamente significativos de cada uno de los factores sobre los contenidos de folatos así como su interacción. Estos resultados son importantes para demostrar el efecto que sobre el contenido de folatos en cotiledón tiene la simbiosis de la plántula con *R. etli*.

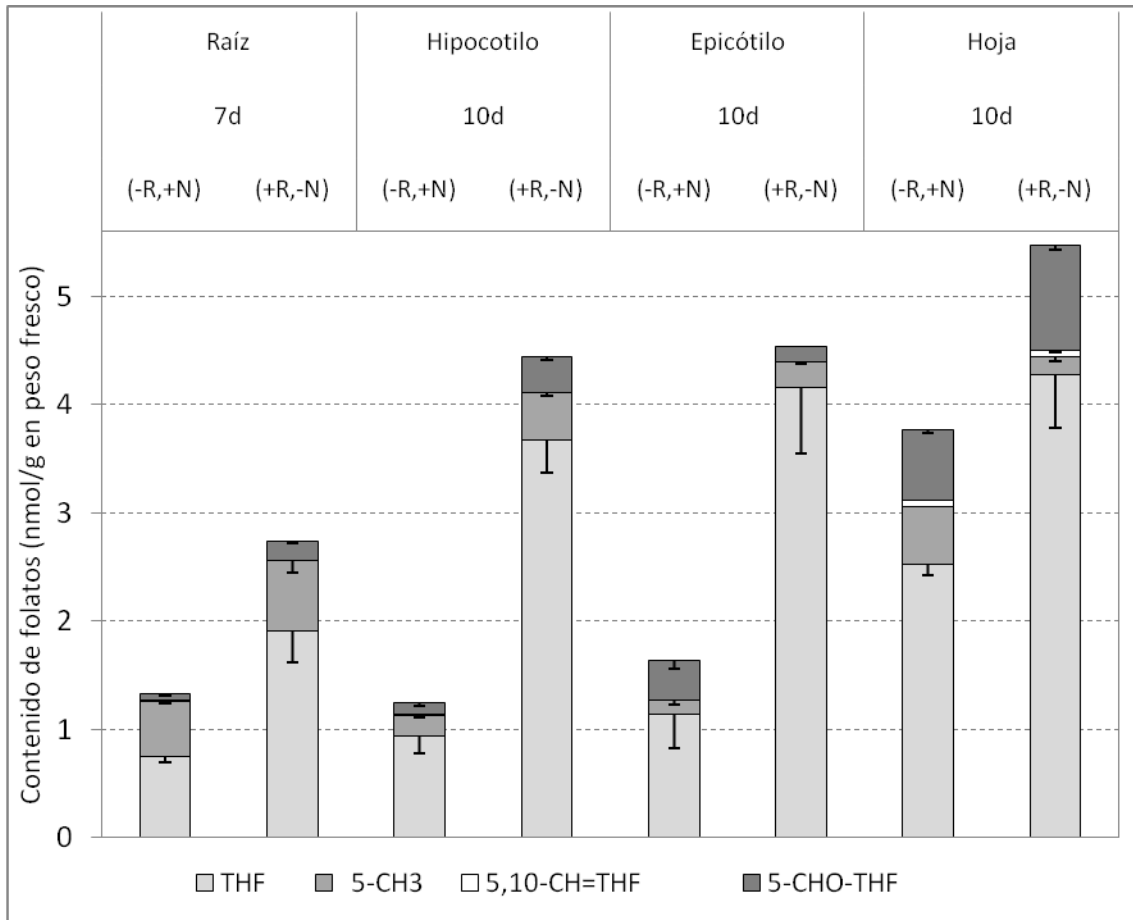
**Tabla 4.2** valores *P* obtenidos por ANOVA con un nivel de significancia del 5% para contenido de folatos en cotiledón de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.), utilizando el programa MINITAB 14

<b>Factores</b>	<b>THF</b>	<b>5-CH<sub>3</sub>- THF</b>	<b>5-CHO- THF</b>
<b><i>R. etli</i> (A)</b>	0.159	0.000	0.461
<b>Tiempo (B)</b>	0.123	0.000	0.170
<b>Interacción AB</b>	0.002	0.000	0.027

#### **4.4 Folatos en hojas**

Se ha reportado que durante la germinación en chícharo (*P. sativum*) la concentración de folatos en las hojas se incrementa gradualmente hasta alcanzar su máximo después de 7 días de desarrollo, cuando el aparato fotosintético está totalmente desarrollado (Vauclare, Diallo, Bourguignon, Macherel, & Douce, 1996). Estos cambios corresponden a una biosíntesis de *novo* desencadenada por la adquisición de la fotosíntesis.

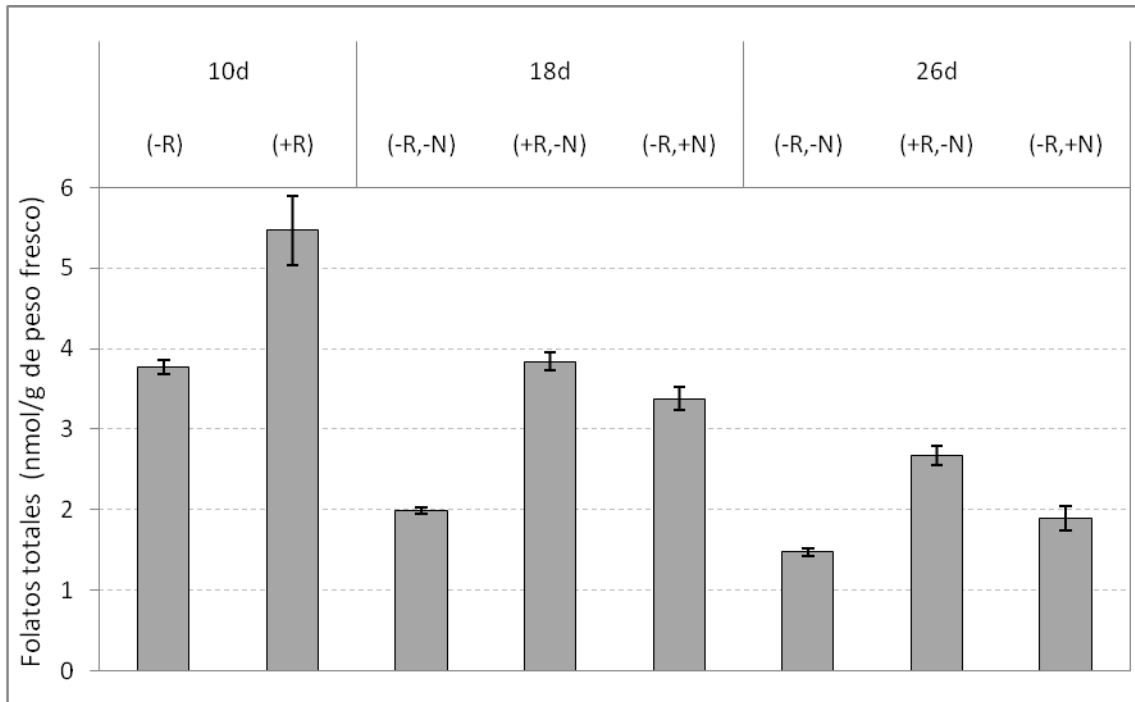
Al igual que después de 10 días de desarrollo el contenido de folatos en las hojas corresponde a dos o tres veces más que en otros tejidos (Gambonnet et al., 2001), menos en frijol inoculado donde la hoja es mayoritaria pero hipocótilo y epicótilo presentan altos contenidos (Figura 4.6). Los mayores contenidos de folatos en hoja de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.), se presentan a los 10 días de desarrollo para aquellas plantas inoculadas con *Rhizobium*, (Figura 4.6).



**Figura 4.6** Contenido de folatos en raíz, hipocótilo, epicótilo y hoja de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.). Mediciones realizadas durante diferentes días de desarrollo post-germinación, a tratamientos con (+R) y sin (-R) *Rhizobium etli*, así como con (+N<sub>2</sub>) y sin (-N<sub>2</sub>) fuente de nitrógeno. Las barras indican el error estándar calculado para cada clase de folato.

La distribución de las clases de folatos (Figura 4.7), difieren de las reportadas para hoja de chícharo (*P. sativum*) a los 11 días (Chan & Cossins, 2003), donde la especie mayoritaria fue 5-CH<sub>3</sub>-THF seguida de THF. Nuestros resultados demuestran que efectivamente los contenidos de folatos en hojas son mayores que en otros tejidos para el 10 día de desarrollo post-germinación, sin embargo, estos descienden hasta casi la mitad en plantas inoculadas y no inoculadas para el

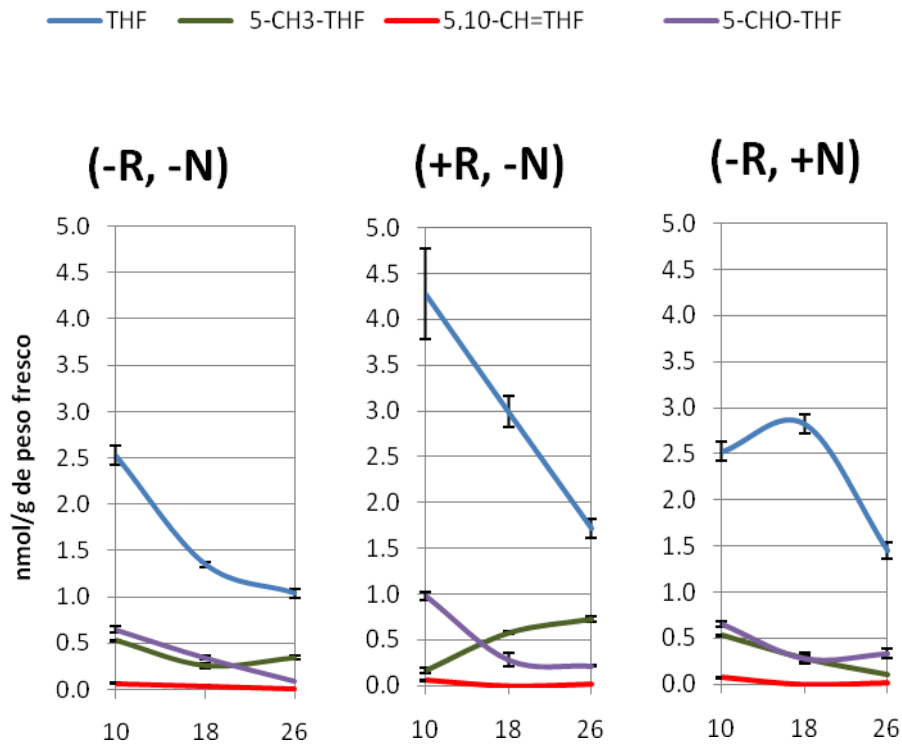
día 26. En comparación con los contenidos en hojas maduras de chícharo (*P. sativum*) donde los folatos se mantienen 3 veces más altos que en otros órganos (Sahr, et al., 2005). Al parecer las hojas más jóvenes aun en crecimiento contienen más folatos que las hojas ya maduras en frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.).



**Figura 4.7** Contenido de folatos totales en hoja de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.). Mediciones realizadas durante los días 10, 18 y 26 de desarrollo post-germinación, a tratamientos con (+R) y sin (-R) *Rhizobium etli*, así como con (+N<sub>2</sub>) y sin (-N<sub>2</sub>) fuente de nitrógeno. Las barras indican el error estándar calculado.

En extractos mitocondriales de hojas de chícharo (*P. sativum*) el 56% de los folatos corresponden a 5-CHO-THF, 37% THF y 7% 5-CH<sub>3</sub>-THF (Chan & Cossins, 2003), por lo que se podría considerar que el 5-CHO-THF es una especie predominante en hojas si tenemos en cuenta

que de acuerdo con (Chan & Cossins, 2003; Chen, Chan, & Cossins, 1997) el 50% de los folatos son mitocondriales, otros autores por medio de métodos radio-isotópicos estiman que los cloroplastos contienen aproximadamente el 3% de los folatos totales y las mitocondrias el 30% (Gambonnet, et al., 2001). Los resultados de 5-CHO-THF encontrados en frijol coincidirían con la distribución de 30% de folatos totales en las mitocondrias (Gambonnet, et al., 2001), dado el porcentaje de 5-CHO-THF en comparación con las demás clases de folatos encontrados en especial 5-CH<sub>3</sub>-THF (Figura 4.8).



**Figura 4.8** Contenido de las diferentes clases de folatos en hoja de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.). Mediciones realizadas los días 10, 18 y 26 de desarrollo post-germinación, a tratamientos con (+R) y sin (-R) *Rhizobium etli*, así como con (+N<sub>2</sub>) y sin (-N<sub>2</sub>) fuente de nitrógeno. Las barras indican el error estándar calculado para cada clase de folato.

Parte de los folatos sintetizados en tejidos expuestos a la luz pueden contribuir al proceso de fotorespiración, pero la mayoría son acumulados en el compartimento citosólico (Jabrin, Ravanel, Gambonnet, Douce, & Rebeille, 2003) donde probablemente es requerido en la síntesis de S-adenosilmetionina y 5-CH<sub>3</sub>-THF, sugiriendo una alta actividad metabólica C<sub>1</sub>. Los altos contenidos de THF en muestras de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.) resultan presumiblemente de su biosíntesis en mitocondria.

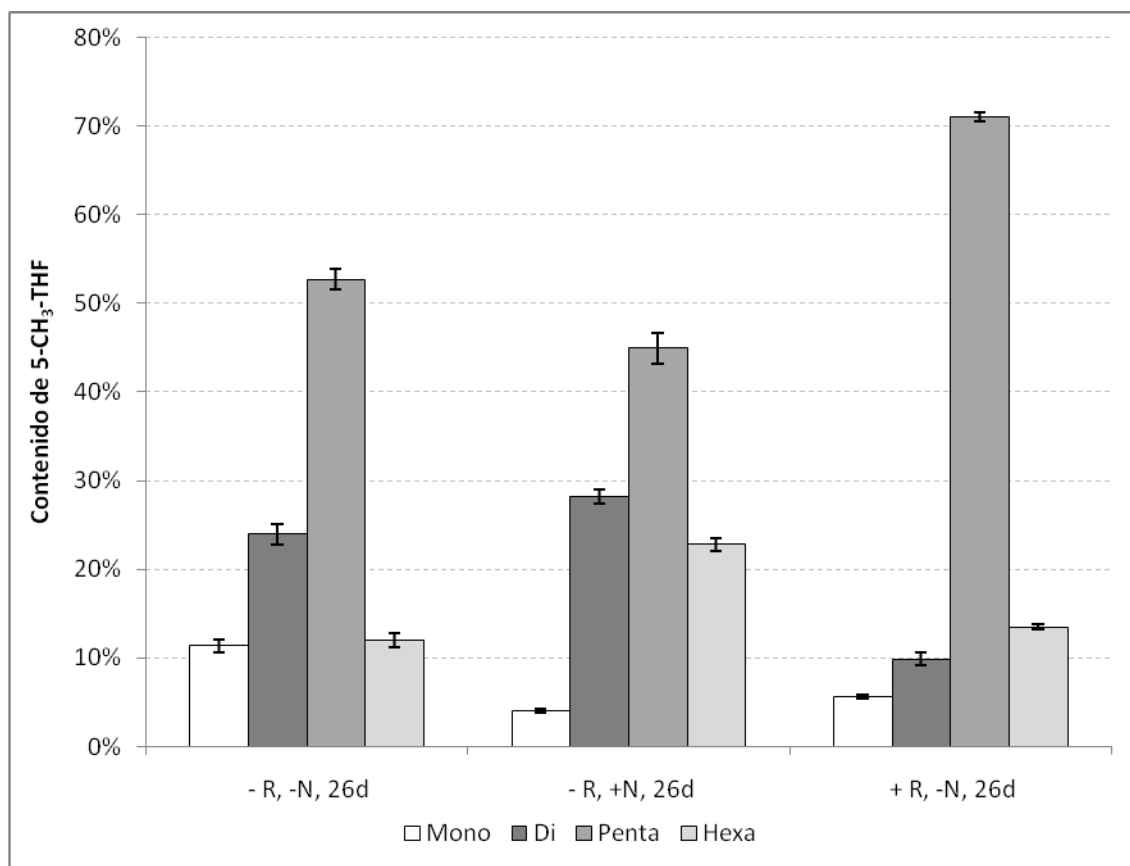
La maquinaria fotosintética cuenta con más de la mitad del nitrógeno en hoja (Evans & Seeman, 1989), por lo que la fotosíntesis es fuertemente afectada por la disponibilidad de nitrógeno. El costo de fijación de nitrógeno para plantas simbióticas es de 25% de todo el carbono fijado por la fotosíntesis durante un día, en comparación con un 13% para plantas en desarrollo bajo condiciones óptimas de disponibilidad de nutrientes. Por lo que una planta dependiente de *Rhizobium* como fuente de nitrógeno tendrá un mayor gasto energético para garantizar su fuente de nitrógeno, en este sentido presumimos que un mayor metabolismo requerirá de mayores contenidos de folatos para garantizar un adecuado funcionamiento del metabolismo C-1, esta suposición está claramente representada en los mayores contenidos de folatos en plantas inoculadas encontrados durante este estudio.

El nivel de significancia obtenido para las diferentes clases de folatos por los diferentes tratamientos planteados a través de la prueba de ANOVA (Tabla 4.3), muestra valores que demuestran los efectos estadísticamente significativos de cada uno de los factores sobre los contenidos de folatos así como su interacción. Estos resultados son importantes para demostrar el efecto que sobre el contenido de folatos en hojas tiene la simbiosis de la plántula con *R. etli*.

**Tabla 4.3** Valores *P* obtenidos por ANOVA con un nivel de significancia del 5% para contenido de folatos en hoja de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.), utilizando el programa MINITAB 14.

<b>Factores</b>	<b>THF</b>	<b>5-CH<sub>3</sub>-THF</b>	<b>5,10-CH=THF</b>	<b>5-CHO-THF</b>
<b><i>R. etli</i> (A)</b>	0.000	0.775	0.982	0.000
<b>Tiempo (B)</b>	0.000	0.002	0.000	0.000
<b>Nitrógeno</b>	0.241	0.000	0.174	0.000
<b>Interacción AB</b>	0.045	0.000	0.04	0.013

También observamos el grado de glutamilación de 5-CH<sub>3</sub>-THF en hojas, gracias a que las propiedades electroquímicas de los folatos son independientes de la longitud de la cadena de glutamato (Bagley & Selhub, 2000). En hojas de chícharo (*P. sativum*) las mitocondrias y cloroplastos contienen principalmente formas poliglutamiladas (>90%) (Besson, Rebeille, Neuburger, Douce, & Cossins, 1993; Imeson, Zheng, & Cossins, 1990). En hojas de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.) al igual que en chícharo (*P. sativum*) (Imeson, et al., 1990), la especie pentaglutamilada de 5-CH<sub>3</sub>-THF es la más abundante, esto es especialmente cierto para las hojas de las plántulas inoculadas con *R. etli* (Figura 4.9).

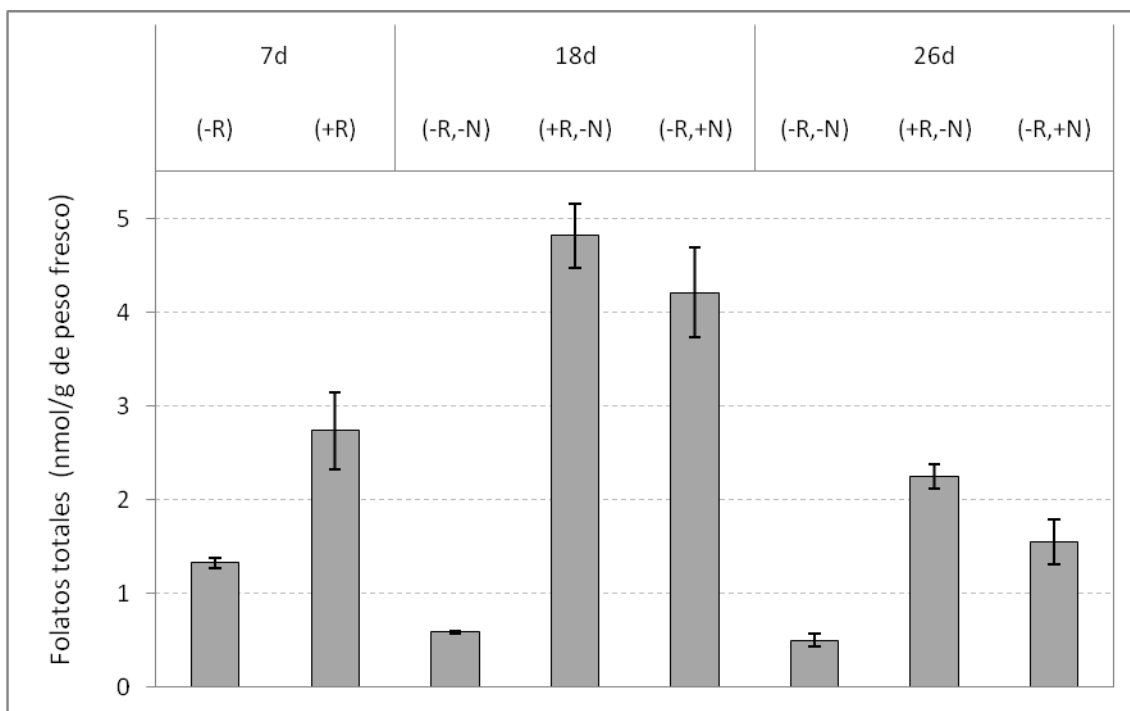


**Figura 4.9** Contenido de folatos poli-glutamilados en hoja de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.). Mediciones realizadas el día 26 de desarrollo post-germinación, a tratamientos con (+R) y sin (-R) *Rhizobium etli*, así como con (+N<sub>2</sub>) y sin (-N<sub>2</sub>) fuente de nitrógeno. Las barras indican el error estándar calculado para cada clase de folato.

#### 4.5 Folatos en raíz

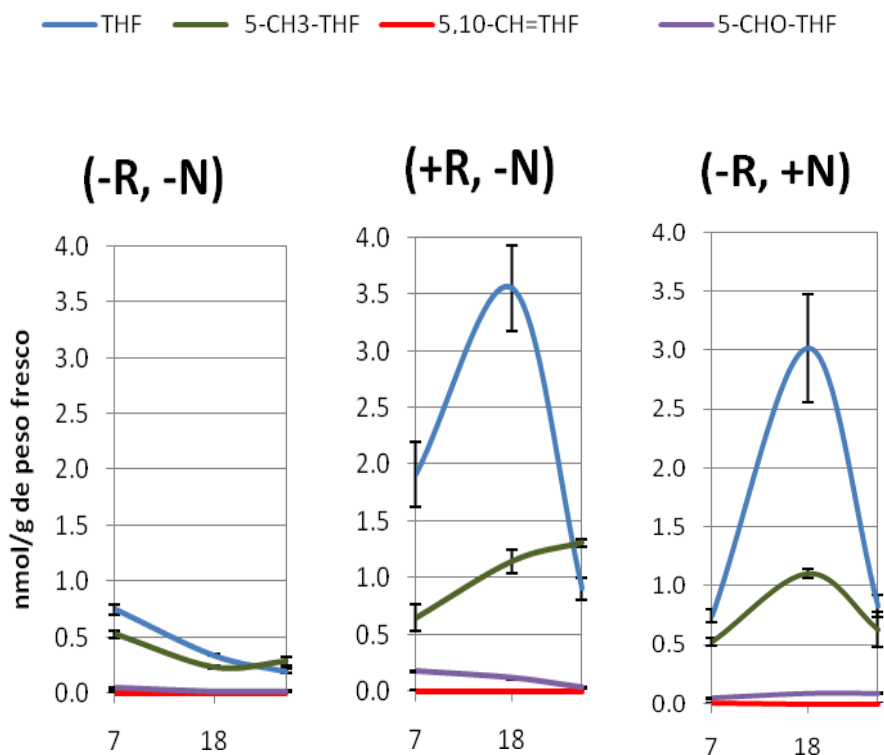
Los mayores contenidos de folatos en raíz de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.), se presentan a los 18 días de desarrollo para aquellas plantas inoculadas con *Rhizobium* (Figura 4.10), la especie mayoritaria es THF con 3.5 nmol/g, seguida de 5-CH<sub>3</sub>-THF (Figura 4.11).





**Figura 4.10** Contenido de folatos en raíz de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.). Mediciones realizadas durante los días 7, 18 y 26 de desarrollo post-germinación, a tratamientos con (+R) y sin (-R) *Rhizobium etli*, así como con (+N<sub>2</sub>) y sin (-N<sub>2</sub>) fuente de nitrógeno. Las barras indican el error estándar calculado.

En chícharo (*P. sativum*) los tejidos meristemáticos de los pelos radiculares contienen 5 veces más folatos que las raíz madura, esto sugiere que los tejidos en proliferación tienen una alta capacidad de sintetizar y acumular coenzimas de folatos (Sahr, et al., 2005). Esta observación tiene relación con los altos requerimientos para la síntesis de nucleótidos en tejidos con activa división y en la utilización de 5,10-CH<sub>2</sub>-THF y 10-CHO-THF para la síntesis de timidilato y purinas (Sahr, et al., 2005) (Figura 2.3).



**Figura 4.11** Contenido de las diferentes clases de folatos en raíz de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.). Mediciones realizadas los días 7, 18 y 26 de desarrollo post-germinación, a tratamientos con (+R) y sin (-R) *Rhizobium etli*, así como con (+N<sub>2</sub>) y sin (-N<sub>2</sub>) fuente de nitrógeno. Las barras indican el error estándar calculado para cada clase de folato.

A las 24 horas de imbibición, en chícharo (*P. sativum*), la organogénesis tiene lugar y los niveles de folatos en los diferentes tejidos evolucionan diferentemente. En las raíces y tallos de chícharo (*P. sativum*) los contenidos de folatos son en principio comparables con los medidos en el embrión luego descienden lentamente con el tiempo. De acuerdo con (Gambonnet, et al., 2001) ese lento descenso puede reflejar el conjunto de vasos implicados en el sistema de transporte en xilema, los cuales están compuestos por células muertas que presumiblemente no contienen folatos. En frijol se observa un incremento lento en los contenidos de folatos en raíz que

alcanzan su máximo al día 18 y luego desciende a casi la mitad, excepto para el tratamiento (-R, -N<sub>2</sub>).

En las raíces las células que son parte del nódulo producen una serie de diferentes proteínas como efecto de la simbiosis con *R. etli*, suponemos que los mayores contenidos de proteína exigen a la planta mayor contenido de folatos para la metilación de dichas proteínas.

El requerimiento de purinas como uno de los pasos para la exportación de nitrógeno desde las células infectadas al resto de la planta, requiere para su producción de la intervención de folatos, esto podría explicar los mayores contenidos de folatos en raíces inoculadas con *Rhizobium* que en aquellas no inoculadas, en particular una vez que se ha iniciado la fijación del nitrógeno atmosférico por parte de la nitrogenasa.

Las explicaciones dadas de los contenidos de folatos en raíces relacionadas con el proceso de infección y posteriormente con mantener la endosimbiosis las consideramos aplicables solo a la raíz dado que la simbiosis legumbre- *Rhizobium* solo tiene lugar en la estructuras conocidas como nódulos radiculares (Crawford, Kahn, & Long, 2001), construidos por la planta en respuesta a señales de la bacteria.

El nivel de significancia obtenido para las diferentes clases de folatos por los diferentes tratamientos planteados a través de la prueba de ANOVA (Tabla 4.4), muestra valores que demuestran los efectos estadísticamente significativos de cada uno de los factores sobre los

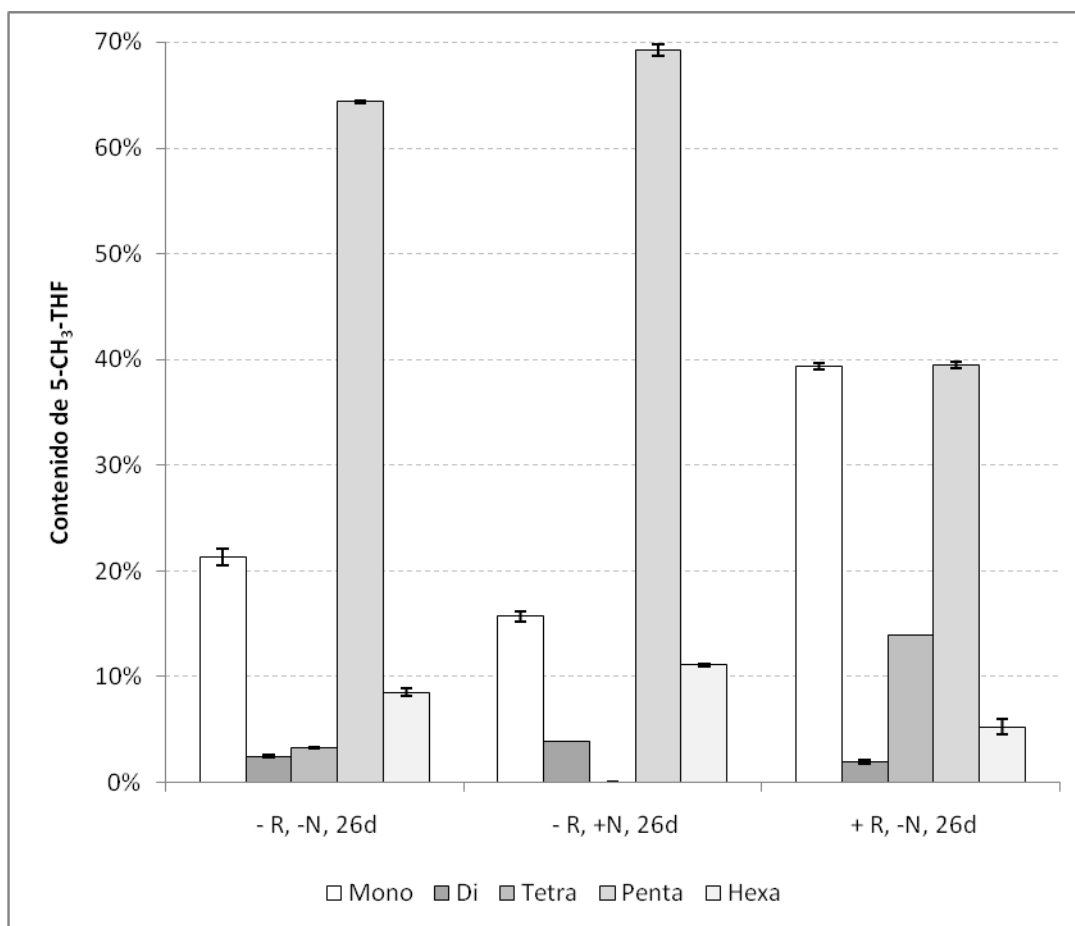
contenidos de folatos así como su interacción. Estos resultados son importantes para demostrar el efecto que sobre el contenido de folatos en raíz tiene la simbiosis de la plántula con *R. etli*.

**Tabla 4.4** Valores *P* obtenidos por ANOVA con un nivel de significancia del 5% para contenido de folatos en raíz de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.), utilizando el programa MINITAB

14

<b>Factores</b>	<b>THF</b>	<b>5-CH<sub>3</sub>-THF</b>	<b>5-CHO-THF</b>
<b><i>R. etli</i> (A)</b>	0.000	0.000	0.000
<b>Tiempo (B)</b>	0.000	0.040	0.000
<b>Nitrógeno</b>	0.011	0.021	0.000
<b>Interacción AB</b>	0.142	0.000	0.000

También observamos el grado de glutamilación de 5-CH<sub>3</sub>-THF en raíces, aprovechando que la longitud de la cadena de glutamato no afecta las propiedades electroquímicas de los folatos (Bagley & Selhub, 2000). En raíces de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.), la especie pentaglutamada de 5-CH<sub>3</sub>-THF es la más abundante, salvo para las raíces de las plántulas inoculadas con *R. etli*, donde su contenido es parecido al mono-glu (Figura 4.12).

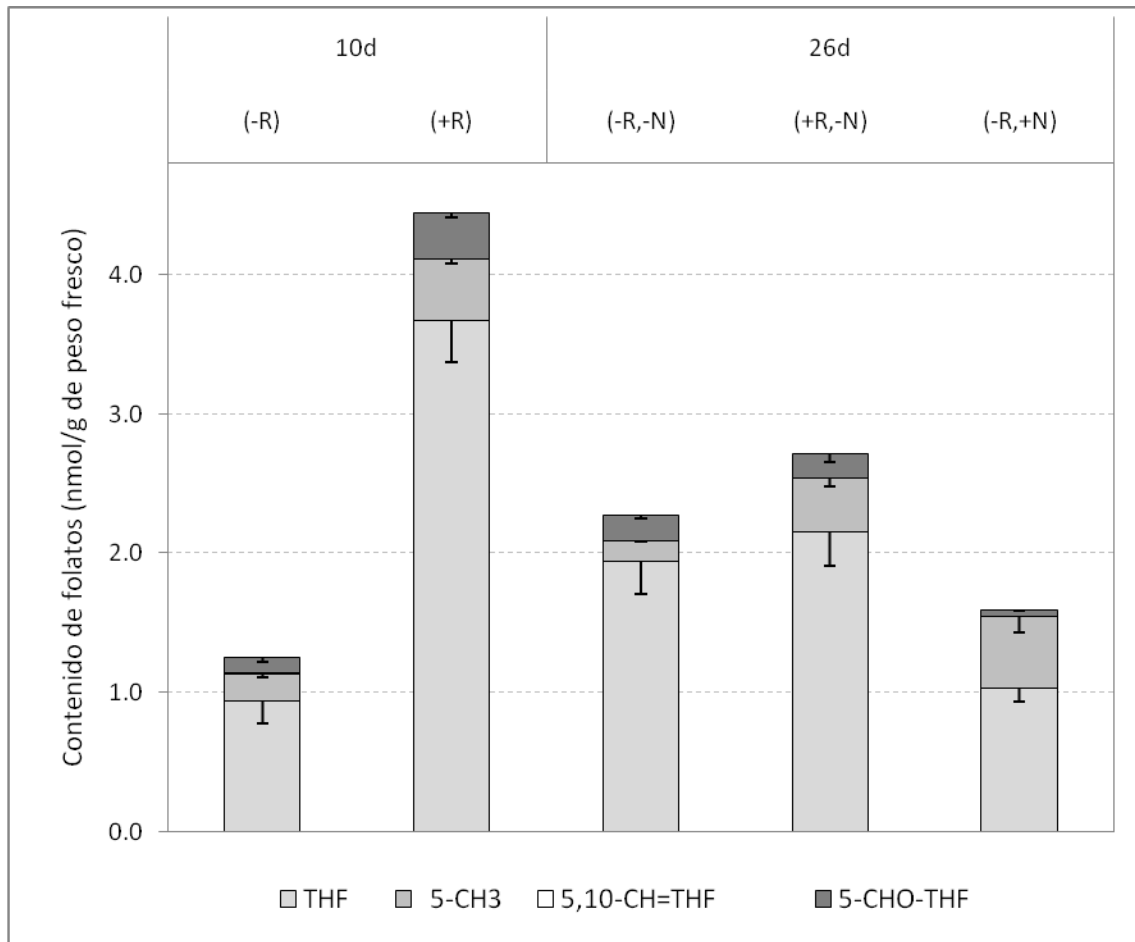


**Figura 4.12** Contenido de folatos poli-glutamilados en raíz de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.). Mediciones realizadas el día 26 de desarrollo post-germinación, a tratamientos con (+R) y sin (-R) *Rhizobium etli*, así como con (+N<sub>2</sub>) y sin (-N<sub>2</sub>) fuente de nitrógeno. Las barras indican el error estándar calculado para cada clase de folato.

#### 4.6 Folatos en Hipocótilo

Para el caso de los hipocótilos, tejido presente en plantas epigeas como el frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.), su comportamiento es muy diferente de acuerdo con el tratamiento aplicado, a

los 10 días de desarrollo en plantas inoculadas con *R. etli* es el tejido con tercer mayor contenido de folatos después de hoja y epicótilo (Figura 4.6), estos contenidos disminuyen del día 7 al 26 sin variar mucho la distribución de las clases de folatos presentes (Figura 4.13).



**Figura 4.13** Contenido de folatos en hipocótilo de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.). Mediciones realizadas durante diferentes días de desarrollo post-germinación, a tratamientos con (+R) y sin (-R) *Rhizobium etli*, así como con (+N<sub>2</sub>) y sin (-N<sub>2</sub>) fuente de nitrógeno. Las barras indican el error estándar calculado para cada clase de folato.

Los contenidos totales en hipocótilo son menores que en hoja de 2 a 3 veces para el día 10 en aquellas plantas no inoculadas, presentando la misma tendencia encontrada en chícharo (*P. sativum*) (Gambonnet, et al., 2001; Jabrin, et al., 2003; Ravanel et al., 2001), dicha tendencia no se presenta en el hipocótilo de plántulas inoculadas con *R. etli*. Esto nos sugiere que los mayores contenidos de folatos en estos tejidos se deben a la necesidad metabólica de la planta de generar y transportar fuentes de carbono y glutamato al bacteroide y de utilizar los ureidos: alantoina y ácido alantoico enviados desde los nódulos en las raíces.

El nivel de significancia obtenido para las diferentes clases de folatos por los diferentes tratamientos planteados a través de la prueba de ANOVA (Tabla 4.5), muestra valores que demuestran los efectos estadísticamente significativos de cada uno de los factores sobre los contenidos de folatos así como su interacción. Estos resultados son importantes para demostrar el efecto que sobre el contenido de folatos en hipocótilo tiene la simbiosis de la plántula con *R. etli*.

**Tabla 4.5** Valores *P* obtenidos por ANOVA con un nivel de significancia del 5% para contenido de folatos en hipocótilo de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.), utilizando el programa MINITAB 14.

<b>Factores</b>	<b>THF</b>	<b>5-CH<sub>3</sub>-THF</b>	<b>5-CHO-THF</b>
<b><i>R. etli</i> (A)</b>	0.000	0.002	0.008
<b>Tiempo (B)</b>	0.271	0.378	0.252
<b>Nitrógeno</b>	0.014	0.007	0.017
<b>Interacción AB</b>	0.000	0.966	0.006

## 4.7 Folatos en Embrión

Los mayores contenidos de folatos en embrión de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.), se presentan para plantas inoculadas con *R. etli*, a los 3 días de desarrollo, siendo la especie mayoritaria el THF con 5.08 nmol/g, seguida de 5-CH<sub>3</sub>-THF.

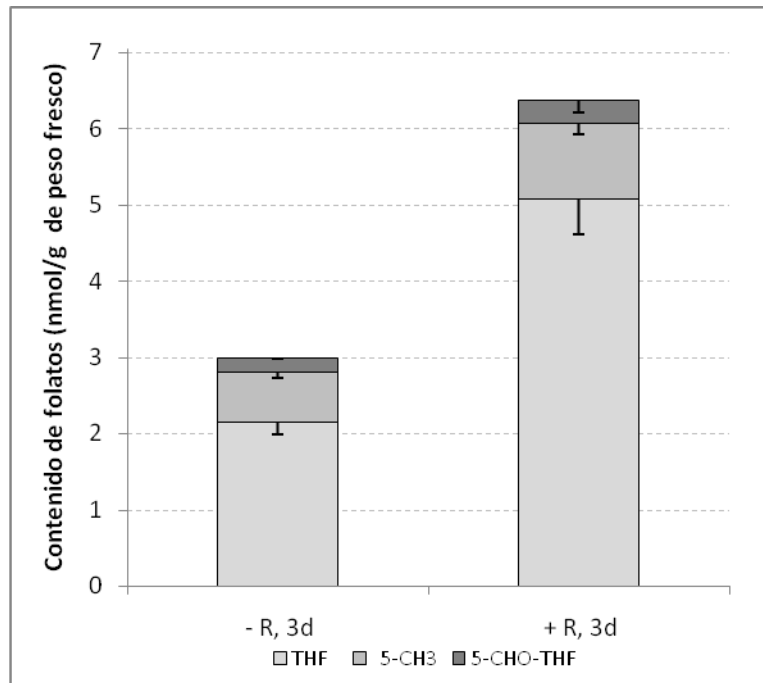
La síntesis de THF en los embriones durante la germinación se debe a la transición de quiescencia a un estado de actividad metabólica y una reanudación de la actividad del ciclo celular (Bewley, 1997). Tomando en cuenta el rol de los folatos en la síntesis de ácidos nucleicos y metilación del ADN, es de suponer que la demanda por folatos se incrementa en la fase S del ciclo celular de la planta en la que el genoma es duplicado (Gambonnet, et al., 2001).

Los primeros estudios de contenidos de folatos durante germinación, fueron desarrollados en chícharo (*P. sativum*) (Spronk & A., 1972), estos encontraron que después de 12 horas de imbibición la concentración de folatos fue mayor en el embrión (1.5-1.9 nmol/g de peso fresco) que en los cotiledones (0.2-0.3 nmol/g de peso fresco).

En frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.), los contenidos de folatos en embrión durante la imbibición presentan un valor tres veces mayor al de los cotiledones para aquellas semillas inoculadas con *Rhizobium* (Figura 4.14), para semillas no inoculadas los cotiledones tienen casi el doble que los embriones, esta diferencia solo puede tener por explicación la inoculación con *Rhizobium*, que desde el principio está acelerando el desarrollo de la planta, si el incremento se



debiera a las bacterias adheridas a las semillas los contenidos en cotiledones deberían ser altos como en el embrión, pero al ser menores implican la utilización y transporte de estos a tejidos en desarrollo, adicionalmente los contenidos totales (cotiledón + embrión) de folatos de las inoculadas y las no inoculadas son similares, 8.27 Vs 8.36 nmol/g respectivamente.



**Figura 4.14** Contenido de folatos en embrión de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.). Mediciones realizadas durante diferentes días de desarrollo post-germinación, a tratamientos con (+R) y sin (-R) *Rhizobium etli*, así como con (+N<sub>2</sub>) y sin (-N<sub>2</sub>) fuente de nitrógeno. Las barras indican el error estándar calculado para cada clase de folato.

Los resultados nos hacen pensar que los mayores contenidos de folatos en aquellas plántulas inoculadas puede deberse a las exigencias impuestas por el ataque de *R. etli* que hidroliza parcialmente las células de la planta para poder ingresar en ella. Mientras la planta se defiende

produciendo quitinasas que hidrolizan los factores nod de las especies de *Rhizobium* (Mellor & Collinge, 1995).

El nivel de significancia obtenido para las diferentes clases de folatos por los diferentes tratamientos planteados a través de la prueba T (Tabla 4.6), muestra valores que demuestran los efectos estadísticamente significativos de cada uno de los factores sobre los contenidos de folatos así como su interacción. Estos resultados son importantes para demostrar el efecto que sobre el contenido de folatos en embrión tiene la simbiosis de la plántula con *R. etli*.

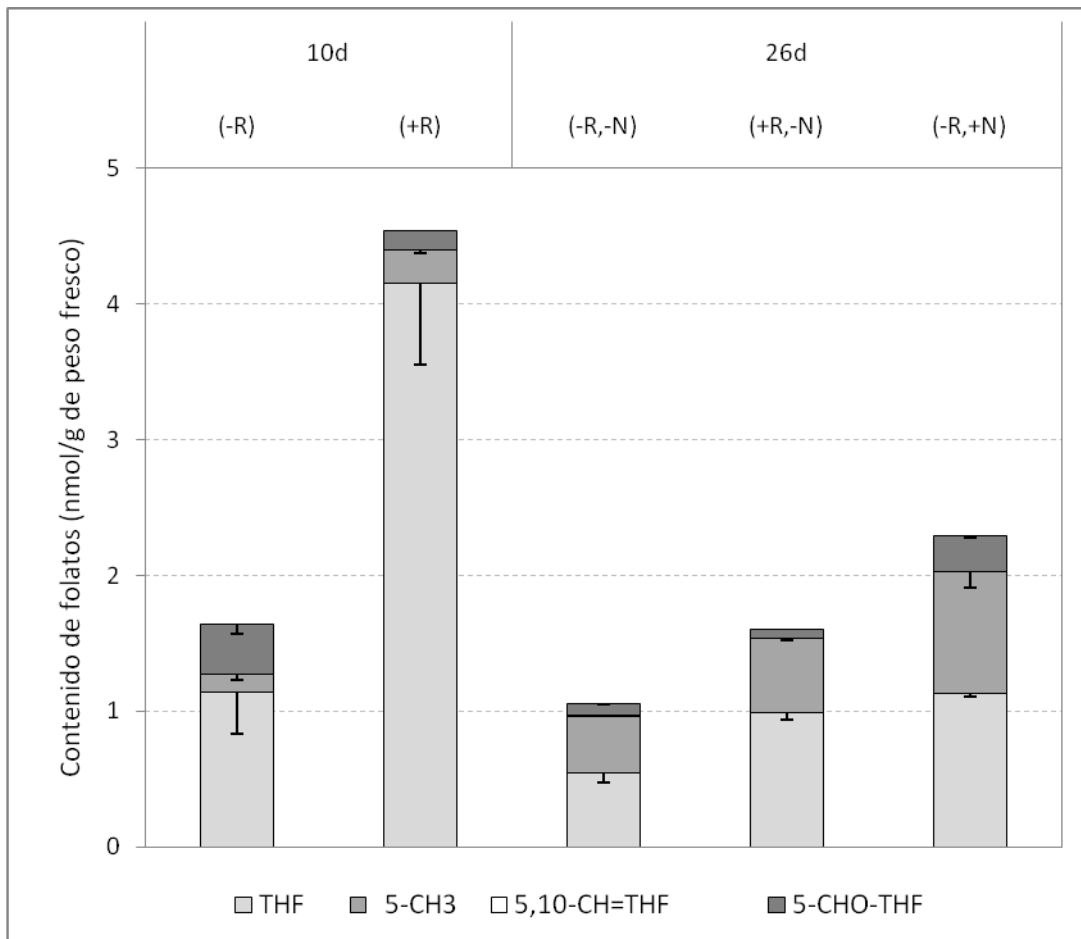
**Tabla 4.6** Valores *P* obtenidos por prueba T con un nivel de significancia del 5% para contenido de folatos en Embrión de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.), utilizando el programa MINITAB 14.

Factores	THF	5-CH <sub>3</sub> -THF	5-CHO-THF
<i>R. etli</i>	0.002	0.056	0.271

#### 4.8 Folatos en Epicótilo

Los mayores contenidos de folatos en epicótilo de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.), se presentan para plantas inoculadas con *R. etli*, a los 10 días de desarrollo, siendo la especie mayoritaria el THF con 4,16 nmol/g, seguida de 5-CH<sub>3</sub>-THF (Figura 4.15). Los contenidos totales en epicótilo son menores que en hoja de 2 a 3 veces para el día 10 en aquellas plantas no inoculadas, presentando la misma tendencia encontrada en chícharo (*P. sativum*) (Gambonnet, et

al., 2001; Jabrin, et al., 2003; Ravanel, et al., 2001), dicha tendencia no se presenta en el epicótilo de plántulas inoculadas con *R. etli*. Esto nos sugiere que los mayores contenidos de folatos en estos tejidos se deben a la necesidad metabólica de la planta de generar y transportar fuentes de carbono y glutamato al bacteroide y de utilizar los ureidos: alantoina y ácido alantoico enviados desde los nódulos en las raíces.



**Figura 4.15** Contenido de folatos en epicótilo de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.). Mediciones realizadas durante diferentes días de desarrollo post-germinación, a tratamientos con (+R) y sin (-R) *Rhizobium etli*, así como con (+N<sub>2</sub>) y sin (-N<sub>2</sub>) fuente de nitrógeno. Las barras indican el error estándar calculado para cada clase de folato.

El nivel de significancia obtenido para las diferentes clases de folatos por los diferentes tratamientos planteados a través de la prueba de ANOVA (Tabla 4.7), muestra valores que demuestran los efectos estadísticamente significativos de cada uno de los factores sobre los contenidos de folatos así como su interacción. Estos resultados son importantes para demostrar el efecto que sobre el contenido de folatos en epicótilo tiene la simbiosis de la plántula con *R. etli*.

**Tabla 4.7** Valores *P* obtenidos por ANOVA con un nivel de significancia del 5% para contenido de folatos en Epicótilo de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.), utilizando el programa MINITAB 14.

<b>Factores</b>	<b>THF</b>	<b>5-CH<sub>3</sub>-THF</b>	<b>5-CHO-THF</b>
<b><i>R. etli</i> (A)</b>	0.000	0.067	0.008
<b>Tiempo (B)</b>	0.000	0.000	0.000
<b>Nitrógeno</b>	0.376	0.002	0.012
<b>Interacción AB</b>	0.002	0.932	0.006

## Capítulo V CONCLUSIONES

En este trabajo se estudió por primera vez los contenidos de folatos, así como la distribución de las distintas clases, en diferentes tejidos de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.), durante desarrollo post-germinación. Las condiciones experimentales incluyeron plantas en desarrollo bajo condiciones de nutrientes óptimas, de estrés e inoculadas con *R. etli*.

Se realizaron innovaciones en las técnicas analíticas, utilizando por primera vez una mezcla de isoformas de conjugasa vegetal para lograr la deglutamilación de los folatos. Los resultados obtenidos en el proceso de deconjugación de folatos con las enzimas  $\gamma$ -glutamyl hidolasa (GGH) 1 y 2 de *Arabidopsis*, demuestran su eficiencia para el análisis de folatos monoglutamilados en matrices vegetales.

Se determinó la necesidad de utilizar el tratamiento con calor, posterior a la homogenización de la muestra y previo al tratamiento con proteasas, para muestras procesadas con tratamiento trienzimático, con el fin de inactivar enzimas que pueden interconvertir los folatos, y de esta manera cuantificar las diferentes clases de folatos naturales. Esta metodología de extracción es diferente a la propuesta por Hyun & Tamura, 2005, para determinación de folatos en alimentos, donde recomiendan no aplicar el tratamiento térmico antes de la proteasa por considerarlo redundante y generador de pérdidas.

Se obtuvo nueva información sobre los contenidos de folatos en frijol, estableciendo que los contenidos de folatos en semilla de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.) son 2.32 nmol/g o 106

$\mu\text{g}/100\text{g}$ . Dicha información es valiosa como base para el análisis nutricional de las dietas de las poblaciones que lo consumen. Dicho análisis nutricional deberá profundizar, a partir de la información presentada, en el efecto sobre los folatos de los diferentes tratamientos culinarios usados en las poblaciones que se estudien.

Los resultados obtenidos también son una fuente de información valiosa para estudios fisiológicos en la especie, tanto en condiciones de suministro de nutrientes óptimas, como en condiciones sub óptimas por falta de fuentes de nitrógeno así como en plantas que derivan sus fuentes de nitrógeno de la endosimbiosis con *R. etli*, siendo estas tres condiciones posibles de encontrar en plantaciones tradicionales de frijol. Los resultados de esta investigación establecen el potencial beneficio en aquellas plantaciones de frijol inoculadas con *R. etli*, al presentar mayores contenidos de folatos para el normal metabolismo de las plántulas, en especial en tierras con carencia de nitrógeno como es el caso particular de la mayor parte de las tierras destinadas al cultivo del frijol en México (Broughton et al., 2003).

Los resultados muestran que la deficiencia en nitrógeno ocasiona disminución en el *pool* de folatos en todos los tejidos, principalmente en hipocótilo y epicótilo jóvenes, demostrando la importancia del suministro de este nutriente para el adecuado metabolismo de la planta, así como el impacto que tiene sobre la calidad nutricional de la planta.

En esta investigación obtuvimos nueva información sobre la distribución de folatos en frijol, encontrando que en todos los tejidos de frijol la principal clase de folato presente es el THF, resultados inesperados por cuanto en la mayoría de los vegetales reportados predomina el 5-CH<sub>3</sub>-

THF (Konings et al., 2001; Vahteristo, Lehtikoinen, Ollilainen, & Varo, 1997), considerado un excelente candidato como forma de almacenamiento por ser altamente estable y fácilmente convertible a otra clase de folato a través de la reacción reversible de 5,10 Meteniltetrahidrofolato sintetasa MTHFR (EC 3.5.4.9) (Roje et al., 1999), sin embargo, en otras especies como el centeno (*Secale cereale*) (Kariluoto, 2008), las dos terceras partes del pool de folatos son formas formiladas, como el 5-CHO-THF y el 10-CHO-THF y el 5-CH<sub>3</sub>-THF es una cuarta parte del pool de la vitamina. En maní (*Arachis hypogea*) el 5-CHO-THF es la más abundante y en soya (*Glicine max*) al igual que en frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.) el THF es el más abundante (Rychlik, et al., 2007).

Un campo poco explorado es el de la degradación de folatos en plantas (Hanson & Gregory, 2002), por lo que futuros trabajos podrían contribuir al conocimiento en esta área basándose en los resultados obtenidos por la presente investigación para lo cual se podría medir la síntesis de THF en la planta mediante análisis de transcripción reversa semicuantitativa (RT-PCR por sus siglas en inglés) de la abundancia relativa del mRNA que codifica para la dihidropterina pirofosforoquinasa-dihidropteroato sintetasa (HPPK-DHPS), enzima bifuncional que cataliza las primeras dos reacciones específicas de la síntesis de THF, así como también analizar la expresión de la proteína HPPK-DHPS por western blot.

Nuestros hallazgos de THF como la clase de folato más abundante en semillas de frijol negro Jamapa 81 (*P. vulgaris* L.), al igual que en todos los tejidos de la planta durante el desarrollo post-germinación, sugieren que los contenidos de la vitamina pueden tener pérdidas importantes durante el procesado, por lo que dentro de una estrategia de biofortificación por ingeniería

metabólica se deberá además del aumento de la producción de los precursores de la molécula de folato, pteridina y ácido p-aminobenzoico a través de la sobre-expresión de la GTP ciclohidrolasa I y la aminodeoxicorismato sintetasa (R. I. Diaz de la Garza, Gregory, & Hanson, 2007), respectivamente, se deberá incluir una enzima que interconvierta los altos contenidos de THF a una clase de folato más oxidado como 5-CH<sub>3</sub>-THF y/o 5-CHO-THF.

Nuestro próximo objetivo será determinar los contenidos de folatos en frutos y semillas de plantas inoculadas con *R. etli* ferti-irrigadas con solución Hoagland libre de nitrógeno, y plantas no inoculadas ferti-irrigadas con solución Hoagland, para conocer si estos presentan la tendencia mostrada por la planta a lo largo de su desarrollo post-germinación, y de esta manera determinar si la inoculación con *R. etli*, se constituye en una forma de biofortificación de folatos en frijol, que puede llegar a beneficiar a sus consumidores.



## Capítulo VI BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, G. J. A., & Perez, H. P. (2003). La situación del cultivo del frijol en México. Producción e Investigación.
- Adamson, P. (2004) Vitamin & Mineral Deficiency: A Global Progress Report. Micronutrient Initiative and UNICEF.
- Augustin, J., & Klein, B. (1989). Legumes: Chemistry, Technology and Human Nutrition. New York: Marcel Dekker Inc.
- Augustin, J., Klein, B. P., Becker, D., & Venugopal, P. B. (1985). Methods of Vitamin Assay. New York: Wiley.
- Baev, N., Schultze, M., Barlier, I., Ha, D. C., Virelizier, H., Kondorosi, E., et al. (1992). Rhizobium nodM and nodN genes are common nod genes: nodM encodes functions for efficiency of nod signal production and bacteroid maturation. J Bacteriol, 174(23), 7555-7565.
- Bagley, P. J., & Selhub, J. (1998). A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 95(22), 13217-13220.
- Bagley, P. J., & Selhub, J. (2000). Analysis of folate form distribution by affinity followed by reversed-phase chromatography with electrical detection. Clin Chem, 46(3), 404-411.
- Bailey, L. B. (1995). Folate requirements and dietary recommendations. In L. B. Bailey (Ed.), Folate (pp. 123-151). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Bank, W. (2007). Integración del mercado norteamericano de frijol seco: implicaciones para los productores y consumidores mexicanos, 16.
- Bedhomme, M., Hoffmann, M., McCarthy, E. A., Gambonnet, B., Moran, R. G., Rebeille, F., et al. (2005). Folate metabolism in plants: an Arabidopsis homolog of the mammalian mitochondrial folate transporter mediates folate import into chloroplasts. J Biol Chem, 280(41), 34823-34831.
- Bekaert, S., Storozhenko, S., Mehrshah, P., Bennett, M. J., Lambert, W., Gregory, J. F., et al. (2008). Folate biofortification in food plants. Trends in Plant Science, 13(1), 28-35.
- Bender, D. A. (1997). Introduction to nutrition and metabolism (2 ed.). London.

- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von-Heijne, G., & Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol*, 340(4), 783-795.
- Besson, V., Rebeille, F., Neuburger, M., Douce, R., & Cossins, E. A. (1993). Effects of tetrahydrofolate polyglutamates on the kinetic parameters of serine hydroxymethyltransferase and glycine decarboxylase from pea leaf mitochondria. *Biochem J*, 292 ( Pt 2), 425-430.
- Bewley, J. D. (1997). Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell*, 9(7), 1055-1066.
- Bird, O. D., Robbins, M., Vandenbelt, J. M., & Pfiffner, J. J. (1946). OBSERVATIONS ON VITAMIN Bc CONJUGASE FROM HOG KIDNEY. *J. Biol. Chem.*, 163(3), 649-659.
- Bohlool, B. B., Ladha, J. K., Garrity, D. P., & George, T. (1992). Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture. *Plant Soil*, 141, 1-11.
- Bouis, H. E. (2002). Plant breeding: A new tool for fighting micronutrient malnutrition. *Journal of Nutrition*, 132(3), 491S-494S.
- Bouis, H. E. (2003). Micronutrient fortification of plants through plant breeding: can it improve nutrition in man at low cost? *Proc Nutr Soc*, 62(2), 403-411.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- Bravo, A., & Mora, J. (1988). Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* by the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway. *J Bacteriol*, 170(2), 980-984.
- Broughton, W. J., Hernandez, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., & J., V. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. *Plant and Soil*, 252, 55-128.
- Broughton, W. J., Jabbouri, S., & Perret, X. (2000). Keys to symbiotic harmony. *J Bacteriol*, 182(20), 5641-5652.
- Brzezinska, A., Winska, P., & Balinska, M. (2000). Cellular aspects of folate and antifolate membrane transport. *Acta Biochim Pol*, 47(3), 735-749.
- Caballero, B. (2002). Global patterns of child health: The role of nutrition. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 46, 3-7.
- Chan, C., Shin, Y. S., & Stokstad, E. L. (1973). Studies of folic acid compounds in nature. 3. Folic acid compounds in cabbage. *Can J Biochem*, 51(12), 1617-1623.

- Chan, S. Y., & Cossins, E. A. (2003). The intracellular distribution of folate derivatives in pea leaves (vol 14, pg 67, 2003). [Correction]. *Pteridines*, 14(3), 67-76.
- Chang, Z., & Gage, D. A. (2003). Extraction, purification, and detection by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry of tetrahydrofolate metabolites in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Sci.*, 32-36.
- Chave, K. J., Auger, I. E., Galivan, J., & Ryan, T. J. (2000). Molecular modeling and site-directed mutagenesis define the catalytic motif in human gamma -glutamyl hydrolase. *J Biol Chem*, 275(51), 40365-40370.
- Chen, L., Chan, S. Y., & Cossins, E. A. (1997). Distribution of Folate Derivatives and Enzymes for Synthesis of 10-Formyltetrahydrofolate in Cytosolic and Mitochondrial Fractions of Pea Leaves. *Plant Physiol*, 115(1), 299-309.
- Choi, S. W., & Mason, J. B. (2000). Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J Nutr*, 130(2), 129-132.
- Clandinin, M. T., & Cossins, E. A. (1972). Localization and interconversion of tetrahydropteroylglutamates in isolated pea mitochondria. *Biochem J*, 128(1), 29-40.
- Clarke, R., Smith, A. D., Jobst, K. A., Refsum, H., Sutton, L., & Ueland, P. M. (1998). Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 55(11), 1449-1455.
- Coffin, J. W., & Cossins, E. A. (1986). Mitochondrial folates and methionyl-tRNA transformylase activity during germination and early growth of seeds. *Phytochemistry*, 25(11), 2481-2487.
- Cosseau, C., Garnerone, A. M., & Batut, J. (2002). The fixM flavoprotein modulates inhibition by AICAR or 5'AMP of respiratory and nitrogen fixation gene expression in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Plant Microbe Interact*, 15(6), 598-607.
- Cossins, E. (2000). The fascinating world of folate and one-carbon metabolism. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, 78(6), 691-708.
- Cossins, E. A. (1980). *The Biochemistry of Plants* (Vol. 2). New York: Academic Press.
- Cossins, E. A. (1984). Folates in biological materials. In R. L. B. Blakley, Stephen J. (Ed.), *folates and pterins* (Vol. 1, pp. 1-59). New York.
- Cossins, E. A. (1987). *The Biochemistry of Plants* (Vol. 11). New York: Academic Press.

- Cossins, E. A., & Chen, L. (1997). Folates and one-carbon metabolism in plants and fungi. *Phytochemistry*, 45(3), 437-452.
- Crawford, N., Kahn, M., & Long, S. (2001). Nitrogen and Sulfur. In B. Buchanan, W. Gruissem & R. Jones (Eds.), *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*.
- Czeizel, A. E., & Dudas, I. (1992). Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med*, 327(26), 1832-1835.
- Dang, J., Arcot, J., & Shrestha, A. (2000). Folate retention in selected processed legumes. *Food Chemistry*, 68(3), 295-298.
- Darnton-Hill, I., Webb, P., Harvey, P. W., Hunt, J. M., Dalmiya, N., Chopra, M., et al. (2005). Micronutrient deficiencies and gender: social and economic costs. *Am J Clin Nutr*, 81(5), 1198S-1205S.
- de Bree, A., Verschuren, W. M., Blom, H. J., & Kromhout, D. (2001). Association between B vitamin intake and plasma homocysteine concentration in the general Dutch population aged 20-65 y. *Am J Clin Nutr*, 73(6), 1027-1033.
- De Brouwer, V., Zhang, G. F., Storozhenko, S., Van Der Straeten, D., & Lambert, W. E. (2007). pH stability of individual folates during critical sample preparation steps in prevision of the analysis of plant folates. *Phytochemical Analysis*, 18, 496-508.
- De Souza, S., & Eitenmiller, R. (1986). Effects of Processing and Storage on the Folate Content of Spinach and Broccoli. *Food Science*, 51(3), 626-628.
- Delgado, A., Bonet, A., & Gepts, P. (1988). The wild relative of *Phaseolus vulgaris* in middle America. In P. Gepts (Ed.), *Genetic resources of Phaseolus beans* (pp. 163-184). Dordrecht: Kluwer Academic.
- DellaPenna, D., & Pogson, B. J. (2006). Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annu Rev Plant Biol*, 57, 711-738.
- Diaz de la Garza, R. I., Gregory, J. F., 3rd, & Hanson, A. D. (2007). Folate biofortification of tomato fruit. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(10), 4218-4222.
- Diaz de la Garza, R., Quinlivan, E. P., Klaus, S. M., Basset, G. J., Gregory, J. F., 3rd, & Hanson, A. D. (2004). Folate biofortification in tomatoes by engineering the pteridine branch of folate synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(38), 13720-13725.
- Dilworth, M. J., & Glenn, A. R. (1991). *Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation*: Elsevier Publishing Company.

- Dixon, R. A., & Paiva, N. L. (1995). Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell*, 7(7), 1085-1097.
- Dusha, I., & Kondorosi, A. (1993). Genes at different regulatory levels are required for the ammonia control of nodulation in *Rhizobium meliloti*. *Mol Gen Genet*, 240(3), 435-444.
- Eardly, B. D., Young, J. P., & Selander, R. K. (1992). Phylogenetic position of *Rhizobium* sp. strain Or 191, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, based on partial sequences of the 16S rRNA and *nifH* genes. *Appl Environ Microbiol*, 58(6), 1809-1815.
- Engelhardt, R., & Gregory III, J. F. (1990). Adequacy of enzymic deconjugation in quantification of folate in foods. *J. Agric. Food Chem*, 38(1), 154-158.
- Evans, J. R., & Seeman, J. R. (1989). The allocation of protein nitrogen in the photosynthetic apparatus: Costs, consequences, and control. In W. R. Briggs (Ed.), *Photosynthesis*. New York: Alan Liss Inc.
- FAO, Food Agriculture Organization. (1997). Preventing micronutrient malnutrition: a guide to food-based approaches. Why policy makers should give priority to food-based strategies.
- Fava, M., Borus, J. S., Alpert, J. E., Nierenberg, A. A., Rosenbaum, J. F., & Bottiglieri, T. (1997). Folate, vitamin B12, and homocysteine in major depressive disorder. *Am J Psychiatry*, 154(3), 426-428.
- Fazili, Z., & Pfeiffer, C. M. (2004). Measurement of folates in serum and conventionally prepared whole blood lysates: application of an automated 96-well plate isotope-dilution tandem mass spectrometry method. *Clin Chem*, 50(12), 2378-2381.
- Flores, M., Morales, L., Avila, A., Gonzalez, V., Bustos, P., Garcia, D., et al. (2005). Diversification of DNA sequences in the symbiotic genome of *Rhizobium etli*. *J Bacteriol*, 187(21), 7185-7192.
- Fox, J. T., & Stover, P. J. (2008). Folate-mediated one-carbon metabolism. *Vitam Horm*, 79, 1-44.
- Freisleben, A., Schieberle, P., & Rychlik, M. (2003). Comparison of folate quantification in foods by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection to that by stable isotope dilution assays using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 315(2), 247-255.

- Galivan, J., Ryan, T. J., Chave, K., Rhee, M., Yao, R., & Yin, D. (2000). Glutamyl hydrolase. pharmacological role and enzymatic characterization. *Pharmacol Ther*, 85(3), 207-215.
- Gambonnet, B., Jabrin, S., Ravanel, S., Karan, M., Douce, R., & Rebeille, F. (2001). Folate distribution during higher plant development. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(9), 835-841.
- Garbis, S. D., Melse-Boonstra, A., West, C. E., & van Breemen, R. B. (2001). Determination of folates in human plasma using hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem*, 73(22), 5358-5364.
- Geil, P. B., & Anderson, J. W. (1994). Nutrition and health implications of dry beans: a review. *J Am Coll Nutr*, 13(6), 549-558.
- Gentry, H. S. (1969). Origin of the common bean *Phaseolus vulgaris*. *Econ. Bot.*, 23, 55-69.
- Graham, P. H. (1981). Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: A review. *Field Crops Research*, 4, 93-112.
- Green, R., & Miller, J. W. (1999). Folate deficiency beyond megaloblastic anemia: hyperhomocysteinemia and other manifestations of dysfunctional folate status. *Semin Hematol*, 36(1), 47-64.
- Gregory, J. F., 3rd. (1989). Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability, and bioavailability of dietary folates. *Adv Food Nutr Res*, 33, 1-101.
- Group, M. V. S. R. (1991). Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group. *Lancet*, 338(8760), 131-137.
- Gubler, C. J. (1991). Thiamin. In M. L. J. (Ed.), *Handbook of vitamins* (2 ed., pp. 233-281). New York: Marcel Dekker.
- Gutierrez, J. A. (2009). Comunicación personal de recomendación de inicio de riego de plantas con solución nutritiva Hoagland.
- Hanson, A. D., & Gregory, J. F. (2002). Synthesis and turnover of folates in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(3), 244-249.
- Hanson, A. D., & Roje, S. (2001). One-carbon metabolism in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 52, 119-137.

- Hart, D. J., Finglas, P. M., Wolfe, C. A., Mellon, F., Wright, A. J., & Southon, S. (2002). Determination of 5-methyltetrahydrofolate (<sup>13</sup>C-labeled and unlabeled) in human plasma and urine by combined liquid chromatography mass spectrometry. *Anal Biochem*, 305(2), 206-213.
- Herbert, V. (1967). Biochemical and hematologic lesions in folic acid deficiency. *Am J Clin Nutr*, 20(6), 562-572.
- Hines, J. D., Halsted, C. H., Griggs, R. C., & Harris, J. W. (1968). Megaloblastic anemia secondary to folate deficiency associated with hypothyroidism. *Ann Intern Med*, 68(4), 792-805.
- Hoagland, D. R., & Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular*, 347, 1-32.
- Hook, E. B. (1992). Congenital malformations worldwide: A report from the international clearinghouse for birth defect monitoring systems. *Am J Hum Genet*, 51(4), 919-920.
- Hoppner, K., & Lampi, B. (1992). Effect of nitrite ingestion on the bioavailability of folate in the rat. *Int J Vitam Nutr Res*, 62(3), 244-247.
- Horne, D. W., Krumdieck, C. L., & Wagner, C. (1981). Properties of folic acid gamma-glutamyl hydrolase (conjugase) in rat bile and plasma. *J Nutr*, 111(3), 442-449.
- Houston, D. K., Johnson, M. A., Nozza, R. J., Gunter, E. W., Shea, K. J., Cutler, G. M., et al. (1999). Age-related hearing loss, vitamin B-12, and folate in elderly women. [Article]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69(3), 564-571.
- Huangpu, J., Pak, J. H., Graham, M. C., Rickle, S. A., & Graham, J. S. (1996). Purification and molecular analysis of an extracellular gamma-glutamyl hydrolase present in young tissues of the soybean plant. *Biochem Biophys Res Commun*, 228(1), 1-6.
- Hungria, M., Joseph, C. M., & Phillips, D. A. (1991). Rhizobium nod Gene Inducers Exuded Naturally from Roots of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol*, 97(2), 759-764.
- Hurdle, A. D., Barton, D., & Searles, I. H. (1968). A method for measuring folate in food and its application to a hospital diet. *Am J Clin Nutr*, 21(10), 1202-1207.
- Hyun, T. H., & Tamura, T. (2005). Trienzyme extraction in combination with microbiologic assay in food folate analysis: an updated review. *Exp Biol Med (Maywood)*, 230(7), 444-454.

- Imeson, C. H., Zheng, L., & Cossins, E. A. (1990). Folylpolyglutamate Derivatives of *Pisum sativum* L. Determination of Polyglutamate Chain Lengths by High Performance Liquid Chromatography Following Conversion to p-aminobenzoylpolyglutamates. *Plant Cell Physiol.*, 31, 223-231.
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía de México. (2006). El sector alimentario en México, 2006.
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía de México. (2007). Boletín de estadísticas vitales: 2005. Retrieved from <http://148.201.96.14/dc/ver.aspx?ns=000262139>
- INSP, Instituto Nacional de Salud Pública de México. (2002). Estadísticas de mortalidad en México: muertes registradas en el año 2000. *Salud pública Méx*, 44(3), 266-282.
- Jabrin, S., Ravanel, S., Gambonnet, B., Douce, R., & Rebeille, F. (2003). One-carbon metabolism in plants. Regulation of tetrahydrofolate synthesis during germination and seedling development. *Plant Physiology*, 131(3), 1431-1439.
- Jones, M. L., & Nixon, P. F. (2002). Tetrahydrofolates are greatly stabilized by binding to bovine milk folate-binding protein. *J Nutr*, 132(9), 2690-2694.
- Kalman, T. J. (1990). Polyglutamylation of folates and antifolates as a target of chemotherapy. In E. Bohvski & D. Shugar (Eds.), *Molecular Aspects of Chemoterapy* (2004/09/28 ed., pp. 139-149). New York: Pergamon Press.
- Kaplan, L. (1981). What is the origin of the common bean? *Econ. Bot.*, 19, 358-368.
- Kariluoto, M. S., Vahteristo, L. T., & Piironen, V. I. (2001). Applicability of microbiological assay and affinity chromatography purification followed by high-performance liquid chromatography (HPLC) in studying folate contents in rye. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(9), 938-942.
- Kariluoto, S. (2008). Folates in rye: Determination and enhancement by food processing. University of Helsinki, Faculty of Agriculture and Forestry, Department of Applied Chemistry and Microbiology, Food Chemistry Date: 2008-05-09 Level: Doctoral dissertation (article-based).
- Keagy, P. M. (1985). Folacin. In J. Augustin, P. B. Klein & D. A. Becker (Eds.), *Microbiological and Animal Assay*. New York: Wiley.
- Kim, Y. I. (1999). Folate and cancer prevention: a new medical application of folate beyond hyperhomocysteinemia and neural tube defects. *Nutr Rev*, 57(10), 314-321.



- Klaus, S. M., Wegkamp, A., Sybesma, W., Hugenholtz, J., Gregory, J. F., 3rd, & Hanson, A. D. (2005). A nudix enzyme removes pyrophosphate from dihydroneopterin triphosphate in the folate synthesis pathway of bacteria and plants. *J Biol Chem*, 280(7), 5274-5280.
- Kneen, B. E., & Larue, T. A. (1983). Congo Red Absorption by *Rhizobium leguminosarum*. *Appl Environ Microbiol*, 45(1), 340-342.
- Koehler, P., Hartmann, G., Wieser, H., & Rychlik, M. (2007). Changes of folates, dietary fiber, and proteins in wheat as affected by germination. *J Agric Food Chem*, 55(12), 4678-4683.
- Kohashi, M., Inoue, K., Sotobayashi, H., & Iwai, K. (1986). Microdetermination of folate monoglutamates in serum by liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr*, 382, 303-307.
- Kok, R. M., Smith, D. E., Dainty, J. R., Van Den Akker, J. T., Finglas, P. M., Smulders, Y. M., et al. (2004). 5-Methyltetrahydrofolic acid and folic acid measured in plasma with liquid chromatography tandem mass spectrometry: applications to folate absorption and metabolism. *Anal Biochem*, 326(2), 129-138.
- Konings, E. J. M., Roomans, H. H. S., Dorant, E., Goldbohm, R. A., Saris, W. H. M., & van den Brandt, P. A. (2001). Folate intake of the Dutch population according to newly established liquid chromatography data for foods. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(4), 765-776.
- Krishnaswamy, K., & Madhavan Nair, K. (2001). Importance of folate in human nutrition. *Br J Nutr*, 85 Suppl 2, S115-124.
- Krumdieck, C. L., Newman, A. J., & Butterworth, C. E. (1973). A naturally occurring inhibitor of folic acid conjugase (pteroylpolyglutamyl hydrolase) in beans and other pulses. *Am J Clin Nutr*, 267, 460.
- Lambers, H., Chapin III, F. S., & Pons, T. L. (1998). *Symbiotic Associations Plant Physiological Ecology*: Springer.
- Laskowski, M., Mims, V., & Day, P. L. (1945).
- Leichter, J., Landymore, A. F., & Krumdieck, C. L. (1979). Folate conjugase activity in fresh vegetables and its effect on the determination of free folate content. *Am J Clin Nutr*, 32(1), 92-95.

- Li, H., Ryan, T. J., Chave, K. J., & Van Roey, P. (2002). Three-dimensional structure of human gamma -glutamyl hydrolase. A class I glutamine amidotransferase adapted for a complex substrate. *J Biol Chem*, 277(27), 24522-24529.
- Li-Li, Z., Ying, L., Song, L., & Cossins, E. A. (1992). The polyglutamate nature of plant folates. *Phytochemistry*, 31(7), 2277-2282.
- Lin, S., Rogiers, S., & Cossins, E. A. (1993). [ $\gamma$ ]-Glutamyl hydrolase from pea cotyledons. *Phytochemistry*, 32(5), 1109-1117.
- Lodwig, E., & Poole, P. (2003). Metabolism of Rhizobium Bacteroids. *Plant Sciences*, 22(1), 37-78.
- Long, S. R. (1996). Rhizobium symbiosis: nod factors in perspective. *Plant Cell*, 8(10), 1885-1898.
- Lott, J., Ockenden, I., Raboy, V., & Batten, G. (2000). phytic acid and phosphorous in crop seeds and fruits: a global estimate. *Seed Science Research*(10), 11-33.
- Lowe, K. E., Osborne, C. B., Lin, B. F., Kim, J. S., Hsu, J. C., & Shane, B. (1993). Regulation of folate and one-carbon metabolism in mammalian cells. II. Effect of folylpoly-gamma-glutamate synthetase substrate specificity and level on folate metabolism and folylpoly-gamma-glutamate specificity of metabolic cycles of one-carbon metabolism. *J Biol Chem*, 268(29), 21665-21673.
- Lucock, M. (2000). Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Mol Genet Metab*, 71(1-2), 121-138.
- Lucock, M. D., Green, M., Hartley, R., & Levene, M. I. (1993). Physicochemical and biological factors influencing methylfolate stability : use of dithiothreitol for HPLC analysis with electrochemical detection. *Food chemistry*, 47, 79-86.
- Lucock, M. D., Green, M., Priestnall, M., Daskalakis, I., Levene, M. I., & Hartley, R. (1995). Optimisation of chromatographic conditions for the determination of folates in foods and biological tissues for nutritional and clinical work. *Food Chemistry*, 53(3), 329-338.
- Lumley, J., Watson, L., Watson, M., Bower, C., & Dowswell, T. (2001). Periconceptional supplementation with folate and/or multivitamins for preventing neural tube defects. *Cochrane Database Sys Rev* 2001.
- Lyngbye, J., Hansen, S. I., & Holm, J. (1980). Kinetics of folate-protein binding. *Methods Enzymol*, 66, 694-709.

- Ma, Y., & Bliss, F. A. (1978). Seed Proteins of Common Bean. *Crop Sci.*, 18, 431-437.
- Martinez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F. M., Franco, A. A., Graham, P., & Pardo, M. A. (1991). *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int J Syst Bacteriol*, 41(3), 417-426.
- Mason, J. B., & Garcia, M. (1993). Micronutrient deficiency—the global situation (Vol. 9, pp. 11-16): *SCN News*.
- Matherly, L. H., & Goldman, D. I. (2003). Membrane transport of folates. *Vitam Horm*, 66, 403-456.
- Matthews, R. (1996). *Cellular and Molecular Biology*. Washington DC: ASM Press.
- Mayer, J., Pfeffer, W., Beyer, P. (2008), Biofortified crops to alleviate micronutrient malnutrition. *Current Opinion in Plant Biology* 11:166:170
- McEneny, J., Couston, C., McKibben, B., Young, I. S., & Woodside, J. V. (2007). Folate: in vitro and in vivo effects on VLDL and LDL oxidation. *Int J Vitam Nutr Res*, 77(1), 66-72.
- McGuire, J. J., & Coward, J. K. (1984). Pteroylpolyglutamates: Biosynthesis, degradation, and Function. In R. L. Blakley & S. J. Benkovic (Eds.), *Folates and Pteridines* (Vol. 1, pp. 135-190). New York: Wiley.
- McKillop, D. J., Pentieva, K., Daly, D., McPartlin, J. M., Hughes, J., Strain, J. J., et al. (2002). The effect of different cooking methods on folate retention in various foods that are amongst the major contributors to folate intake in the UK diet. *Br J Nutr*, 88(6), 681-688.
- McLean, E., de Benoist, B., & Allen, L. H. (2008). Review of the magnitude of folate and vitamin B12 deficiencies worldwide. *Food Nutr Bull*, 29(2 Suppl), S38-51.
- McNeill, J. R., & Winiwarter, V. (2004). Breaking the sod: humankind, history, and soil. *Science*, 304(5677), 1627-1629.
- McNulty, H., & Pentieva, K. (2004). Folate bioavailability. *Proc Nutr Soc*, 63(4), 529-536.
- Mellor, R. B., & Collinge, D. B. (1995). A simple-model based on known plant defense reactions is sufficient to explain most aspects of nodulation. *Journal of Experimental Botany*, 46(282), 1-18.
- Melse-Boonstra, A., Verhoef, P., Konings, E. J., Van Dusseldorp, M., Matser, A., Hollman, P. C., et al. (2002). Influence of processing on total, monoglutamate and polyglutamate

- folate contents of leeks, cauliflower, and green beans. *J Agric Food Chem*, 50(12), 3473-3478.
- Mendoza, A., Leija, A., Martinez-Romero, E., Hernandez, G., & Mora, J. (1995). The enhancement of ammonium assimilation in *Rhizobium etli* prevents nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *Mol Plant Microbe Interact*, 8(4), 584-592.
- Mendoza, A., Valderrama, B., Leija, A., & Mora, J. (1998). NifA-dependent expression of glutamate dehydrogenase in *Rhizobium etli* modifies nitrogen partitioning during symbiosis. *Mol Plant Microbe Interact*, 11(2), 83-90.
- Merx, H., Seibel, W., Rabe, E., & Menden, E. (1994). Influence of germination parameters on the vitamin content and the microbiological quality of sprout cereals (rye and wheat). *Mehl Brot*, 48, 17-20.
- Muller, H. (1993). [Determination of the folic acid content of vegetables and fruits using high-performance liquid chromatography (HPLC)]. *Z Lebensm Unters Forsch*, 196(2), 137-141.
- Mylona, P., Pawlowski, K., & Bisseling, T. (1995). Symbiotic Nitrogen Fixation. *Plant Cell*, 7(7), 869-885.
- Nap, J. P., & Bisseling, T. (1990). Developmental Biology of a Plant-Prokaryote Symbiosis: The Legume Root Nodule. *Science*, 250(4983), 948-954.
- Nelson, B. C., Dalluge, J. J., & Margolis, S. A. (2001). Preliminary application of liquid chromatography-electrospray-ionization mass spectrometry to the detection of 5-methyltetrahydrofolic acid monoglutamate in human plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 765(2), 141-150.
- Nelson, B. C., Pfeiffer, C. M., Margolis, S. A., & Nelson, C. P. (2003). Affinity extraction combined with stable isotope dilution LC/MS for the determination of 5-methyltetrahydrofolate in human plasma. *Anal Biochem*, 313(1), 117-127.
- Orsomando, G., de la Garza, R. D., Green, B. J., Peng, M., Rea, P. A., Ryan, T. J., et al. (2005). Plant gamma-glutamyl hydrolases and folate polyglutamates: characterization, compartmentation, and co-occurrence in vacuoles. *J Biol Chem*, 280(32), 28877-28884.
- Osborne, C. B., Lowe, K. E., & Shane, B. (1993). Regulation of folate and one-carbon metabolism in mammalian cells. I. Folate metabolism in Chinese hamster ovary cells

- expressing *Escherichia coli* or human polyglutamate synthetase activity. *J Biol Chem*, 268(29), 21657-21664.
- Patriarca, E. J., Tate, R., & Iaccarino, M. (2002). Key role of bacterial NH<sub>4</sub>(<sup>+</sup>) metabolism in Rhizobium-plant symbiosis. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66(2), 203-222.
- Pawlosky, R. J., & Flanagan, V. P. (2001). A quantitative stable-isotope LC-MS method for the determination of folic acid in fortified foods. *J Agric Food Chem*, 49(3), 1282-1286.
- Peralta, H., Mora, Y., Salazar, E., Encarnacion, S., Palacios, R., & Mora, J. (2004). Engineering the nifH promoter region and abolishing poly-beta-hydroxybutyrate accumulation in *Rhizobium etli* enhance nitrogen fixation in symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Appl Environ Microbiol*, 70(6), 3272-3281.
- Pereira, P., & Bliss, F. (1987). Nitrogen fixation and plant growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) at different levels of phosphorus availability. *Plant soil*, 104, 79-84.
- Pfeiffer, C., Rogers, L. M., & Gregory III, J. F. (1997). Determination of Folate in Cereal-Grain Food Products Using Trienzyme Extraction and Combined Affinity and Reversed-Phase Liquid Chromatography - *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (ACS Publications). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(2), 407-413.
- Phillips, D. A., Dakora, F. D., Sande, E., Joseph, C. M., & Zon, J. (1994). Synthesis, release, and transmission of alfalfa signal to rhizobial symbionts. *Plant Soil*, 161, 69-80.
- Plaza, L., de-Ancos, B., & Cano, M. P. (2004). Nutritional and health-related compounds in sprouts and seeds of soybean (*Glycine max*), wheat (*Triticum aestivum*.L) and alfalfa (*Medicago sativa*) treated by a new drying method. *European Food Research and Technology*, 216, 13-144.
- Porter, D. H., Cook, R. J., & Wagner, C. (1985). Enzymatic properties of dimethylglycine dehydrogenase and sarcosine dehydrogenase from rat liver. *Arch Biochem Biophys*, 243(2), 396-407.
- Prell, J., & Poole, P. (2006). Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends Microbiol*, 14(4), 161-168.
- Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group. (1991). *Lancet*, 338(8760), 131-137.

- Quinlivan, E. P., Basset, G. J., Gregory, J. F., & Hanson, A. D. (2005). Evidence for salvage of the folate catabolites dihydropterin-6-aldehyde and p-aminobenzoylglutamate in plants. *Faseb Journal*, 19(4), A826-A826.
- Quinlivan, E. P., Hanson, A. D., & Gregory, J. F. (2006). The analysis of folate and its metabolic precursors in biological samples. *Analytical Biochemistry*, 348(2), 163-184.
- Quinlivan, E. P., McPartlin, J., Weir, D. G., & Scott, J. (2000). Mechanism of the antimicrobial drug trimethoprim revisited. *FASEB J*, 14(15), 2519-2524.
- Rajesh, R., & Thomas, S. V. (2001). Prenatal screening for neural tube defects. *National Medical Journal of India*, 14(6), 343-346.
- Ramirez, M., Graham, M. A., Blanco-Lopez, L., Silvente, S., Medrano-Soto, A., Blair, M. W., et al. (2005). Sequencing and analysis of common bean ESTs. Building a foundation for functional genomics. *Plant Physiol*, 137(4), 1211-1227.
- Ravel, S., Cherest, H., Jabrin, S., Grunwald, D., Surdin-Kerjan, Y., Douce, R., et al. (2001). Tetrahydrofolate biosynthesis in plants: molecular and functional characterization of dihydrofolate synthetase and three isoforms of folylpolyglutamate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(26), 15360-15365.
- Ravel, S., Gakiere, B., Job, D., & Douce, R. (1998). The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(13), 7805-7812.
- Rimm, E. B. (2001). Folate and vitamin B6 from diet and supplements in relation to risk of coronary heart disease among women. *Bibl Nutr Dieta*(55), 42-45.
- Roje, S., Wang, H., McNeil, S. D., Raymond, R. K., Appling, D. R., Shachar-Hill, Y., et al. (1999). Isolation, characterization, and functional expression of cDNAs encoding NADH-dependent methylenetetrahydrofolate reductase from higher plants. *J Biol Chem*, 274(51), 36089-36096.
- Rolfe, B. G., & Gresshoff, P. M. (1988). Genetic Analysis of Legume Nodule Initiation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39, 297-319.
- Roos, A. J., & Cossins, E. A. (1971). Pteroylglutamate derivatives in *Pisum sativum* L. Biosynthesis of cotyledonary tetrahydropteroylglutamates during germination. *Biochem J*, 125(1), 17-26.
- Ros, G., Bernal, M. J., Olivares, A. B., Periago, M. J., & Martínez, C. (2002). Funcionalidad de Folatos en la Dieta. Grupo de Nutrición y Bromatología.

- Rychlik, M., Englert, K., Kapfer, S., & Kirchhoff, E. (2007). Folate contents of legumes determined by optimized enzyme treatment and stable isotope dilution assays. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(5), 411-419.
- Sadowsky, M. J., Cregan, P. B., & Keyser, H. H. (1988). Nodulation and Nitrogen Fixation Efficacy of *Rhizobium fredii* with *Phaseolus vulgaris* Genotypes. *Appl Environ Microbiol*, 54(8), 1907-1910.
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y alimentación de México. (2007). Situación actual y perspectiva de Frijol en México 2000-2005.
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y alimentación de México. (2009). <http://www.sagarpa.gob.mx/delegaciones/inicio/tlaxcala/Lists/Boletines/Attachments/45/Recupera.pdf>
- Sahr, T., Ravanel, S., & Rebeille, F. (2005). Tetrahydrofolate biosynthesis and distribution in higher plants. *Biochem Soc Trans*, 33(Pt 4), 758-762.
- Sathe, S. K., Deshpande, S. S., & Salunkhe, D. K. (1984). Dry beans of *Phaseolus*. A review. Part 1. Chemical composition: proteins. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 20(1), 1-46.
- Schirch, V., & Strong, W. B. (1989). Interaction of folylpolyglutamates with enzymes in one-carbon metabolism. *Arch Biochem Biophys*, 269(2), 371-380.
- Scott, J. M. (1984). Catabolism of folates. In R. L. Blakley & S. J. Benkovic (Eds.), *Folates and Pterins Volume 1: Chemistry and Biochemistry* (Vol. 1, pp. 307-327). New York: Wiley-Interscience.
- Scott, J., Rebeille, F., & Fletcher, J. (2000). Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 795-824.
- SEGEPLAN, Secretaría de Planificación y Programación de la Presidencia de Guatemala. (1991). Encuesta Nacional de Consumo Aparente de Alimentos, Guatemala.
- Segovia, L., Young, J. P., & Martinez-Romero, E. (1993). Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 43(2), 374-377.
- Selhub, J. (1989). Determination of tissue folate composition by affinity chromatography followed by high-pressure ion pair liquid chromatography. *Anal Biochem*, 182(1), 84-93.

- Selhub, J. (1999). Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr*, 19, 217-246.
- Selhub, J., Ahmad, O., & Rosenberg, I. H. (1980). Preparation and use of affinity columns with bovine milk folate-binding protein (FBP) covalently linked to Sepharose 4B. *Methods Enzymol*, 66, 686-690.
- Serrano, L. M. (2004). Analisis del caso frijol.
- Seshadri, S., Beiser, A., Selhub, J., Jacques, P. F., Rosenberg, I. H., D'Agostino, R. B., et al. (2002). Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 346(7), 476-483.
- Seyoum, E., & Selhub, J. (1998). Properties of food folates determined by stability and susceptibility to intestinal pteroylpolyglutamate hydrolase action. *J Nutr*, 128(11), 1956-1960.
- Shane, B. (1989). Folylpolyglutamate synthesis and role in the regulation of one-carbon metabolism. *Vitam Horm*, 45, 263-335.
- Shintani, D., & DellaPenna, D. (1998). Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. *Science*, 282(5396), 2098-2100.
- Soberon-Chavez, G., Najera, R., Espin, G., & Moreno, S. (1991). Formation of *Rhizobium phaseoli* symbiotic plasmids by genetic recombination. *Mol Microbiol*, 5(4), 909-916.
- Somasegaran, P., & Hobben, H. J. (1985). *Methods in legume-Rhizobium technology* (pp. 367). Hawaii: Niftal project.
- Spronk, A. M., & A., C. E. (1972). Folate derivatives of photosynthetic tissues., 11, 3157-3165.
- Staben, C., & Rabinowitz, J. C. (1983). Immunological crossreactivity of eukaryotic C1-tetrahydrofolate synthase and prokaryotic 10-formyltetrahydrofolate synthetase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80(22), 6799-6803.
- Storozhenko, S., De Brouwer, V., Volckaert, M., Navarrete, O., Blancquaert, D., Zhang, G. F., et al. (2007). Folate fortification of rice by metabolic engineering. *Nat Biotechnol*, 25(11), 1277-1279.
- Subbulakshmi, G., & Naik, M. (1999). Food fortification in developing countries - Current status and strategies. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 36(5), 371-395.
- Suh, J. R., Herbig, A. K., & Stover, P. J. (2001). New perspectives on folate catabolism. *Annu Rev Nutr*, 21, 255-282.



- Suormala, T., Gamse, G., & Fowler, B. (2002). 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) assay in the forward direction: residual activity in MTHFR deficiency. *Clin Chem*, 48(6 Pt 1), 835-843.
- Takemura, Y., Kobayashi, H., & Sekiguchi, S. (1996). [Separation of methotrexate-polyglutamates by capillary electrophoresis and its application to the measurement of gamma-glutamyl hydrolase activity in human leukemia cells in culture]. *Rinsho Byori*, 44(1), 51-56.
- Tako, E., Laparra, J. M., Glahn, R. P., Welch, R. M., Lei, X. G., Beebe, S., et al. (2009). Biofortified black beans in a maize and bean diet provide more bioavailable iron to piglets than standard black beans. *J Nutr*, 139(2), 305-309.
- Tani, M., & Iwai, K. (1983). High-performance liquid chromatographic separation of physiological folate monoglutamate compounds. Investigation of absorption and conversion of pteroylglutamic acid in the small intestine of the rat in situ. *J Chromatogr*, 267(1), 175-181.
- Udvardi, M. K., & Day, D. A. (1997). Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48, 493-523.
- Underwood, B. A., & Smitasiri, S. (1999). Micronutrient malnutrition: policies and programs for control and their implications. *Annu Rev Nutr*, 19, 303-324.
- UNICEF, United Nations Children's Fund (2009). Tracking progress on child and maternal nutrition.
- USDA, United States Department of Agriculture. (2005). Search the USDA National Nutrient Database for Standard Reference. <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>
- Vahteristo, L., Lehtikoinen, K., Ollilainen, V., & Varo, P. (1997). Application of an HPLC assay for the determination of folate derivatives in some vegetables, fruits and berries consumed in Finland. *Food Chem.*, 59, 589-597.
- Valderrama, B., Davalos, A., Girard, L., Morett, E., & Mora, J. (1996). Regulatory proteins and cis-acting elements involved in the transcriptional control of *Rhizobium etli* reiterated *nifH* genes. *J Bacteriol*, 178(11), 3119-3126.
- Varela-Moreiras, G., Aperte, E. A., & Póo Prieto, R. (2000). La determinación "in vitro/in vivo" de la biodisponibilidad del ácido fólico contenido en la cerveza.

- Varela-Moreiras, G., Seyoum, E., & Selhub, J. (1991). Combined affinity and ion pair liquid chromatographies for the analysis of folate distribution in tissues. *J. Nutr. Biochem.*(2), 44-53.
- Vauclare, P., Diallo, N., Bourguignon, J., Macherel, D., & Douce, R. (1996). Regulation of the expression of the glycine decarboxylase complex during pea leaf development. *Plant Physiology*, 112(4), 1523-1530.
- Velazquez, O., Rosas, M., Lara, A., Pastelin, G., Sanchez, C., Attie, F., et al. (2003). [Prevalence and interrelations of noncommunicable chronic diseases and cardiovascular risk factors in Mexico. Final outcomes from the National Health Survey 2000]. *Arch Cardiol Mex*, 73(1), 62-77.
- Verhoef, P., Stampfer, M. J., Buring, J. E., Gaziano, J. M., Allen, R. H., Stabler, S. P., et al. (1996). Homocysteine metabolism and risk of myocardial infarction: relation with vitamins B6, B12, and folate. *Am J Epidemiol*, 143(9), 845-859.
- Wang, S. P., & Stacey, G. (1990). Ammonia regulation of nod genes in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Gen Genet*, 223(2), 329-331.
- Wei, M. M., & Gregory, J. F., 3rd. (1998). Organic Acids in Selected Foods Inhibit Intestinal Brush Border Pteroylpolyglutamate Hydrolase in Vitro: Potential Mechanism Affecting the Bioavailability of Dietary Polyglutamyl Folate. *J Agric Food Chem*, 46(1), 211-219.
- Whitehead, L. F., & Day, D. A. (1997). The peribacteroid membrane. *Physiologia Plantarum*, 100(1), 30-44.
- WHO, World Health Organization. (1999). Malnutrition worldwide. In S. World Health Organization. Geneva (Ed.).
- WHO, World Health Organization. (2002). The world health report 2002. Reducing risks, promoting healthy life (pp. 1-168).
- Woeller, C. F., Anderson, D. D., Szebenyi, D. M., & Stover, P. J. (2007). Evidence for small ubiquitin-like modifier-dependent nuclear import of the thymidylate biosynthesis pathway. *J Biol Chem*, 282(24), 17623-17631.
- World-Bank. (2007). Integración del mercado norteamericano de frijol seco: implicaciones para los productores y consumidores mexicanos, 16.
- Yip, R. (1997). The challenge of improving iron nutrition: limitations and potentials of major intervention approaches. *Eur J Clin Nutr*, 51 Suppl 4, S16-24.

Ye, X., Al-Babili, S., Klotti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P., et al. (2000). Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*, 287(5451), 303-305.